

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

**Fluorestsentsil põhineva bioreporterite konstrueerimine valgusünteesi inhibeerivate  
antibiootikumide detekteerimiseks bakteris *Escherichia coli***

Bakalaureusetöö

12EAP

Kadi Sagor

Juhendajad doktorant Mariliis Hinnu, teadur Marta Putrinš

TARTU 2018

## Infoleht

### **Fluorestsentsil põhineva bioreporterit konstrueerimine valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide detekteerimiseks bakteris *Escherichia coli***

Antibiootikumidele resistentsete geenide laialdase leviku tõttu on vaja leida uusi antibiootikume. Potentsiaalsete antibiootikumide tuvastamiseks keskkonnast ja toimemehhanismi kindlaksmääramiseks saab kasutada bioreportereid. Käesolevas bakalaureusetöös konstrueeriti bakteris *Escherichia coli* kaks kahel fluorestseeruval valgul ja modifitseeritud *trp*-operonil põhinevat bioreporterit, mis signaliseerivad ribosoomi seiskumist või mitteseiskumist antibiootikumi juuresolekul. Reportersüsteem töötab, kuid vajab lisakatsetusi.

CERS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia; T490 Biotehnoloogia

Märksõnad: antibiootikum, bakter, resistentsus, fluorestseeruvad valgud, bioreporter, atenuatsioon

### **Constructing a fluorescence-based bioreporter for detecting ribosome inhibiting antibiotics in bacterium *Escherichia coli***

Because of the wide spread of antibiotic resistance genes, it is necessary to discover new antibiotics. For identifying potentially new antibiotics and their mechanism, it is possible to use bioreporters. In this study, two bioreporters were constructed with *Escherichia coli*, based on two fluorescent proteins and a modified *trp*-operon, to signal the inhibition or non-inhibition of a ribosome with antibiotics. The reporter system works, but needs further experiments.

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology; T490 Biotechnology

Keywords: antibiotic, bacterium, resistance, fluorescent protein, bioreporter, attenuation

# SISUKORD

Sisukord	3
Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1. Antibiootikumid	7
1.1.1. Antibiootikumide resistentsuse mehhanismid	8
1.1.2. Valgusünteesile mõjuvad antibiootikumid	8
1.2. Bioreporterid	10
1.2.1. Bioreporterite signaal	11
1.2.2. <i>trp</i> -operon	13
1.3. Bioreporterite kasutusalad	15
1.3.1. Bioreporterite kasutamine antibiootikumidega	16
1.3.2. Atenuatsioonil põhinev CER-RFP-2Ala reporter	17
2. Eksperimentaalsed	19
2.1. Töö eesmärgid	19
2.2. Materjal ja meetodika	19
2.2.1. Töös kasutatud tüved	19
2.2.2. Töös kasutatud söötmed	19
2.2.3. Töös kasutatud antibiootikumid	20
2.2.4. Töös kasutatud praimerid ja plasmiidid	20
2.2.5. Kompetentsete rakkude valmistamine	21
2.2.6. Kloonimine	22
2.2.7. Transformatsioon	24
2.2.8. DMSO säilituskultuur	25
2.2.9. Voolutsütomeeter	25
2.2.10. Mikrotiiterplaadilugeja katse	25
2.3. Tulemused	26

2.3.1. Reporterplasmiidide konstrueerimine	26
2.3.2. Reporterplasmiidide kontrollimine <i>E. coli</i> tüve MG1655 rakkudes	27
2.3.3. Reporterplasmiidide kontrollimine antibiootikumidega	28
2.4. Arutelu	31
Kokkuvõte	33
Summary	34
Kasutatud kirjanduse loetelu	35
Kasutatud veebiaadressid	44
Lisa 1	45
Lisa 2	49
Lisa 3	50
Lihtlitsents	51

## KASUTATUD LÜHENDID

Amp – ampitsilliin

Cam – klooramfenikool

CAT – klooramfenikooli atsetüültransferaas (*chloramphenicol acetyltransferase*),

CER – tsüaansinine fluorestseeruv valk Cerulean

CFP – tsüaansinine fluorestseeruv valk – *cyan fluorescent protein*

CPEC – tsirkulaarne polümeraas-ekstensioonkloonimine – *Circular polymerase extension cloning*

DMSO – dimetüülsulfoksiid

Ery – erütromütsiin

GFP – roheline fluorestseeruv valk – *green fluorescent protein*

PBS - fosfaatpuhver (*phosphate buffered saline*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

PTC – peptidüül-transferaasne keskus – *peptidyl-transferase centre*

RFP – punane fluorestseeruv valk – *red fluorescent protein*

Trp – trüptofaan

## SISSEJUHATUS

Bakterite resistentsus antibiootikumidele on meditsiinivaldkonna üks suurimaid probleeme. Ebamõistlik antibiootikumide kasutamine on viinud resistentsusgeenide ulatuslikule levikule bakterite seas ning aina sagedamini tuleb infektsiooni peatamiseks kasutada mitut antibiootikumi või patsiendile toksilist „viimase võimaluse“ antibiootikumi.

Resistentsusgeenid võivad levida liigisiselt nii vertikaalselt kui horisontaalselt. Samuti võivad need levida ka lähedastele liikidele transduktsiooni, transformatsiooni ning konjugatsiooni teel.

Resistentsusgeenide leviku peatamiseks tuleb kasutada antimikroobseid ühendeid mõistlikult, eemaldada keskkonnast antibiootikumid ning kontrollida loomseid toiduaineid, et need ei sisaldaks antibiootikumide jääke ning resistentsid baktereid. Lisaks sellele tuleb leida uusi antimikroobseid toimeaineid.

Bioreporterid suudavad tuvastada keskkonnast erinevaid ühendeid, sealhulgas antibiootikume, ning tihtipeale ka väiksema kontsentratsiooni juures kui praegu kasutatavad füsikokeemilised määramismeetodid. Samuti on bioreporterite abil võimalik detekteerida uusi antimikroobseid ühendeid, selgitada välja nende toimemehhanism ning seeläbi toota uusi ravimeid.

Ribosoomi atakeerimine ja seeläbi valgusünteesi pärssimine on antimikroobsete ainete üks levinuim sihtmärk bakteris. Osterman *et al.* (2012) konstrueerisid bioreporterit, mis tuvastab translatsiooni inhibeerivaid ühendeid keskkonnast, kuid erinevate katsetuste käigus selgus, et see ei tööta loodetult hästi ning käesoleva töö autor konstrueeris uue bioreporterit, võttes aluseks Osterman *et al.* reporterit.

Antud töö on teostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis Tanel Tensoni juhitud uurimisgrupis.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Antibiootikumid

Alates antibiootikumide avastamisest penitsilliini näol (Fleming, 1929) on antibiootikumid olnud tähtsal kohal bakteritega võitlemises. Antibiootikumid võivad olla bakteritsiidsed või bakteriostaatilised, ehk vastavalt surmavad bakteri või inhibeerivad nende kasvu (Wilson, 2014).

Antibiootikumidel on erinevad sihtmärgid rakus ning viis peamist sihtmärki on:

- a) rakuseina süntees;
- b) valgusüntees;
- c) nukleiinhapete süntees;
- d) metabolismiradade häirimine;
- e) rakumembraani ümberkorraldamine (Džidić *et al.*, 2008).

Antibakteriaalsed ühendid on ühed levinuimad ravimid tervishoius. Nende efektiivsus langeb, sest patogeensete bakterite seas levivad antibiootikumide resistentsusgeenid (Reder-Christ ja Bendas, 2011). Bakterite resistentsuse arenemine antibiootikumidele kiireneb antibiootikumide väärkasutamise tõttu inimeste tervishoius ja veterinaarias ning nende esinemise tõttu keskkonnas ja toidus (Reder-Christ ja Bendas, 2011). Keskkonda ja toitu satuvad antibiootikumid tihti loomakasvatusest. Loomadele antakse antibiootikume lisaks haigustega võitlemisele profülaktikaks ning ka kasvu kiirendamiseks. Süües liha ning tarbides toorest piima võivad antibiootikumidele resistentsed bakterid üle kanduda toidust inimesele ning inimpatogeensed bakterid võivad konjugatsiooni, transformatsiooni või transduktsiooni teel omandada antibiootikumide resistentsusgeene nii sama liigi isenditelt kui sarnastelt liikidelt. (Džidić *et al.*, 2008; Perreten *et al.*, 1997; Smillie *et al.*, 2010; Teuber *et al.*, 1999; Wegener, 2003)

Molekulaarse biotehnoloogia üks eesmärk on leida uusi antibiootikume. Uusi toimeaineid otsitakse nii mikroobide metabolismiproduktidest kui ka sünteetiliste ainete seast, kuid sel viisil antibiootikumide väljatöötamine on väga kulukas ja ajamahukas. Looduslike toimeainete kontsentratsioon ainete segus on tihti liiga madal, et inhibeerida bakterite kasvu ning samuti on vaja leitud toimeaine eraldada. Vaja on kindlaks teha, millise mehhanismi kaudu toimeaine mõjub. Seetõttu on vaja välja töötada süsteem, mis suudaks kindlaks määrata antibiootilisi toimeid ka vaid subinhibitoorsete kontsentratsioonide puhul. (Osterman *et al.*, 2012)

### **1.1.1. Antibiootikumide resistentsuse mehhanismid**

Juba antibiootikumide avastaja, Sir Alexander Fleming, ütles aastal 1945, et antibiootikumide valesti kasutamine võib viia mutantsete bakterite levimiseni, kes on resistentsed antibiootikumile (“Sir Alexander Fleming - Nobel Lecture: Penicillin.”)

Bakteritel on välja kujunenud erinevad mehhanismid, et ellu jääda keskkonnas, kus on antibiootikum. Näiteks:

- a) suudavad bakterid antibiootikumi toimetamolekuli inaktiveerida (Wright, 2005);
- b) suudavad bakterid muuta antibiootikumi sihtmärki rakus, vähendades sellega raku tundlikkust antibiootikumile (Lambert, 2005);
- c) suudavad bakterid antibiootikume rakust välja pumbata ning seeläbi vähendada antibiootikumi kontsentratsiooni rakus sees (Kumar ja Schweizer, 2005);
- d) suudavad bakterid antibiootikumi juuresolekul toota sarnase funktsiooniga ensüümi, mida antibiootikum ei inhibeeri ja seetõttu ei avalda antibiootikum rakule nii suurt mõju (Happi *et al.*, 2005).

Bakterid võivad antibiootikumi resistentsusgeeni omandada või võib neil resistentsus antibiootikumile tekkida mutatsiooni tagajärjel (Džidić *et al.*, 2008). Resistentsusgeeni võivad bakterid omandada konjugatsiooni teel, puutudes kokku juba resistentsse bakteriga, transduktsiooni teel läbi bakteriofaagide või transformatsiooni teel keskkonnast, kuhu on jäänud surnud bakterite DNA-d (Holmes ja Jobling, 1996).

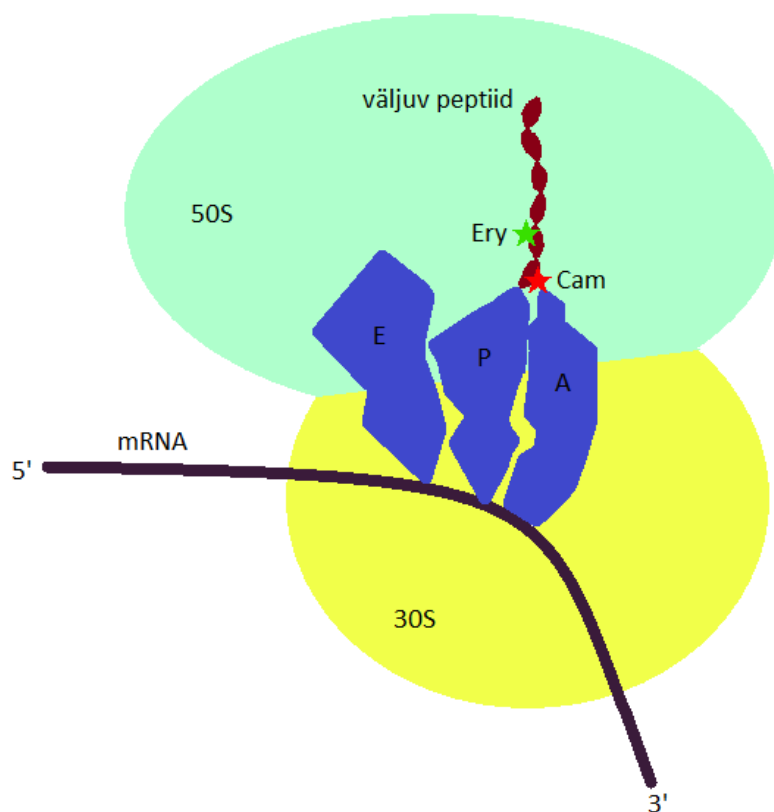
### **1.1.2. Valgusünteesile mõjuvad antibiootikumid**

Ribosoom on looduse vanim, suurim ja kompleksseim ensüüm, mis on üsna konserveerunud ning täidab kõikides organismides sama ülesannet – sünteesib valku (Poehlsgaard ja Douthwaite, 2005).

Ribosoom koosneb 50S ja 30S alaühikust, mis koosnevad kolmest ribosomaalsest RNA-st (16S, 23S, 5S) ning umbes 54-st valgust, sealjuures funktsionaalsetes piirkondades on rRNA (Joonis 1). Valgu süntees koosneb neljast peamisest etapist: initsiatsioon, elongatsioon, terminatsioon ning ribosoomi ühikute taaskasutus. mRNA dekodeerimine algab koodonist AUG, mis paigutatakse P-saiti koos initsiaator tRNA-ga. Edasi tuuakse järgmine tRNA koos aminohappega A-saiti, katalüüsitakse peptiidside ning ribosoom liigub ühe koodoni võrra edasi. Initsiaator tRNA väljub E-saidist. Sünteesitud peptiid väljub ribosoomist väljumistunneli kaudu. Valgu süntees jätkub kuni stop-koodonini. (Wilson, 2014)



Üks antibiootikumide peamisi sihtmärke rakus ongi ribosoom (Wilson, 2014). Ribosoom on suuruselt neli suurusjärku suurem kui keskmine antibiootikumi molekul ja seetõttu on ribosoomil mitmeid erinevaid kohti antibiootikumil seondumiseks (Tenson ja Mankin, 2006).



**Joonis 1. Ribosoomi ehitus ning kasutatud antibiootikumide seondumiskohad. 50S ja 30S – ribosoomi alaühikud; E – ribosoomi E-sait, P – ribosoomi P-sait, A – ribosoomi A-sait; Ery – erütromütsiini seondumiskoht, Cam – klooramfenikooli seondumiskoht.**

Ribosoomi väikese alaühikuga seonduvad tihti aminoglükosiidid, mille sihtmärk on kodeeriv piirkond. Seal inhibeeritakse translatsiooni initsiatsiooni, takistades stabiilse kompleksi tekkimist tRNA ja start-koodoni vahel P-saidis. Veel inhibeeritakse väikeses alaühikus translatsiooni elongatsiooni, takistades tRNA tulekut A-saiti (tetratsükliinid ja streptomütsiinid) ning ribosoomi edasiliikumist mRNA-l (aminoglükosiidid ning tuberaktinomütsiinid) (Tenson ja Mankin, 2006; Wilson, 2014)

Ribosoomi suurema alaühiku peamine sihtmärk antibiootikumile on peptidüültransferaasne keskus ehk PTC (*peptidyl-transferase centre*), kus sünteesitakse peptiidside. Seal kaetakse A-sait (näiteks klooramfenikool, linkosamiidid, oksasolidinoonid) või P-sait (näiteks pleuromutliin). Makroliidid seonduvad ribosoomi suurema alaühiku peptiidi väljumistunnelisse, peptidüültransferaasse tsentri lähedale ja põhjustavad translatsiooni katkemise (Tenson ja Mankin, 2006; Wilson, 2014).

### 1.1.1.1. Klooramfenikool ja erütromütsiin

Antibiootikumid klooramfenikool ja erütromütsiin mõlemad takistavad valgusünteesi, seondudes ribosoomile. Klooramfenikool seondub ribosoomil 50S alaühikuga ja blokeerib peptidüültransferaasset reaktsiooni (Džidić *et al.*, 2008) (Joonis 1). Antibiootikum hoiab ära peptiidsideme tekkimise aminohapete vahele, kattes tRNA seondumiskoha ribosoomil (Wilson, 2014).

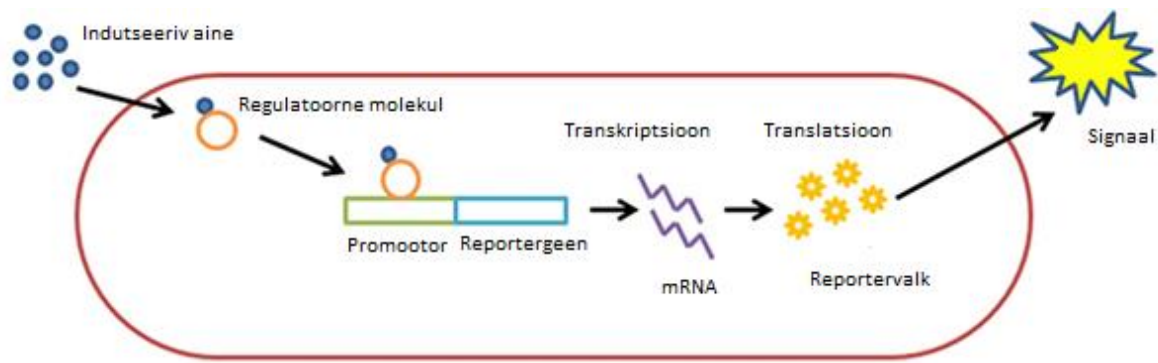
Erütromütsiin on makroliid, mis seondub ribosoomis tRNA väljumistunnelisse ja hoiab sellega ära uue polüpeptiidahela elongatsiooni, indutseerides peptidüül-tRNA eemaldumist ribosoomilt (Wilson, 2014) (Joonis 1). Erütromütsiini seondumine ribosoomiga ei ole väga tugev, molekul tuleb sama kergelt ribosoomi küljest lahti nagu peptidüül-tRNA (Tenson ja Mankin, 2006). Erütromütsiin ei ole väga suur molekul ja jätab ruumi kasvavale peptiidahelale ning inhibeerib translatsiooni alles siis kui sünteesitav ahel on vähemalt viis aminohapet pikk, ent ei mõjuta valgusünteesi kui sünteesitav polüpeptiid on rohkem kui kaheksa aminohapet pikk (Tenson *et al.*, 2003).

Kõige sagedamini klooramfenikoolile resistentsetes tüvedes on olemas klooramfenikooli atsetüültransferaas ehk CAT (*chloramphenicol acetyltransferase*), mis võtab atsetüül-CoA-lt atsüülühma ning lisab selle klooramfenikoolile, mistõttu ei suuda antibiootikum enam ribosoomile seonduda. (Shaw, 1967; Shaw ja Unowsky, 1968)

Klassikaline mutatsioon, mis leidub erütromütsiinile resistentsetes tüvedes, on mutatsioonid ribosoomi valkudes L4 ja L22, mistõttu on peptiidi väljumistunnel veidi kitsam ning antibiootikum ei pääse sisse. Samuti modifitseeritakse erütromütsiini seondumiskohta ribosoomis ning antibiootikum ei suuda sinna enam nii tugevalt seonduda. (Lovmar *et al.*, 2009)

## 1.2. Bioreporterid

Bioreporterid ehk biosensorid on mikroorganismid, rakukultuurid või -liinid, mis on tavaliselt geneetiliselt muundatud, et nad signalseeriks muutusi keskkonnas vastavalt muutuse hulgale (van der Meer ja Belkin, 2010). Reporterraku üldine skeem on toodud joonisel 2.



**Joonis 2. Reporterraku skeem. Indutseeriv aine siseneb raku. Regulatoorne molekul tunneb ära indutseeriva aine ning seondub promootorile, mistõttu algab reportergeeni transkriptsioon. Sellele järgneb reportervalgu translatsioon ja mõõdetava signaali produtseerimine. Kohandatud (Shemer *et al.*, 2015).**

Regulatoorne molekul tunneb raku ära mingi aine ning vastavalt sellele kas repressseerib või derepressseerib geeniekspressiooni.

Vastavalt stressi olemusele saab rakk muuta geeniekspressiooni sigma faktorite abil, mis seonduvad kindlatele promootoritele.  $\sigma^S$  on levinuim alternatiivne sigma faktor, mis reageerib oksüdatiivsele stressile, UV-kiirgusele, kuumašokile, etanoolile, happelisele pH-le, liiga madalale keskkonna osmootsele rõhule (Gruber ja Gross, 2003).

Paljud kemikaalid, sealhulgas antibiootikumid, kutsuvad esile üht või teist tüüpi stressivastust, seega saab neid kasutada paljude asjade hindamiseks. Näiteks toksilisuse hindamiseks kasutatakse tihti bakterite stressipromootoreid. Valitud promootori kontrolli alla pannakse reportervalgu geen. Selline süsteem on osa bakteri tõelisest stressivastuse süsteemist. (van der Meer ja Belkin, 2010)

Vastavalt signaali olemusele kasutatakse erinevaid vahendeid selle detekteerimiseks.

### 1.2.1. Bioreporterite signaal

Bioreporterid võivad anda erinevat signaali. Näiteks ensüümreaktsioonina kasutatakse sageli sini-valge testi. *lacZ* kodeerib ensüümi  $\beta$ -galoktosidaas, mis lagundab süsteemi lisatud substraadi X-gal-i ning tekib värvusreaktsioon (van der Meer ja Belkin, 2010).

Veel kasutatakse keemilist reaktsiooni, mida nimetatakse bioluminesentsiks, mis saadakse lutsiferaasi geenilt (Gould ja Subramani, 1988), mis on eraldatud *Photinus pyralis*-est (de Wet *et al.*, 1987), kes kuulub jaanimardikaliste sugukonda. Bioluminesentsi kodeeriv lutsiferaasi geen, *lux* või *luc*, vastavalt bakteriaalset päritolu või *Photinus pyralis*-est, (Paitan *et al.*, 2004;

Xu *et al.*, 2013) lisatakse huvipakkuva geeni järele ning bioluminesentsi hulga järgi luminomeetri abiga saab hinnata geeniekspressiooni. Lutsiferaas vajab kofaktorit lutsiferiin (Gould ja Subramani, 1988), ent on väga tundlik (Williams *et al.*, 1989).

Väga laialt kasutatakse signaali mõõtmiseks fluorestseeruvaid valke. Fluorestseeruvad valgud on valgud, mis helendavad kui neid ergastada ultravioletvalgusega või valgusega suuremal lainepikkusel (Pakhomov ja Martynov, 2008). Fluorestseeruvad valgud katavad pea kogu värvispektri (Stepanenko *et al.*, 2008). Fluorestseeruvad valgud on laialt kasutatavad tööriistad biotehnoloogias, näiteks saab neid kasutada geeniekspressiooni uurimisel ning valgu lokaliseerimisel (Heim *et al.*, 1994; Ormö *et al.*, 1996; Sample *et al.*, 2009). Fluorestseeruvad valgud ei vaja kofaktoreid või kindlat substraati (Stocker *et al.*, 2003), küll aga on vaja spetsiaalset varustust, et fluorestsentsi registreerida (Xu *et al.*, 2013). Helendus tuleb saadud valguse modifitseerimisest ning taasemiteerimisest (Shashkova ja Leake, 2017).

#### **1.2.1.1. GFP**

Kõige sagedamini räägitakse rohelisest fluorestseeruvast valgust (GFP - *green fluorescent protein*), sest see oli esimene eraldatud fluorestseeruv valk ning see eraldati meduusist *Aequorea victoria* (Tsien, 1998).

GFP ergastusmaksimumid on 395 nm ja 475 nm juures ja emissioonimaksimum 508 nm juures (Ormö *et al.*, 1996). Ergastusmaksimum on ultravioletvalgusele väga lähedal ja GFP visualiseerimine võib kahjustada rakke.

#### **1.2.1.2. TurboRFP**

RFP (*red fluorescent protein*) ehk punane fluorestseeruv valk. TurboRFP on dimeerne punane fluorestseeruv valk, mille ergastusmaksimum on 553 nm juures ja neeldumismaksimum 574 nm juures (Merzlyak *et al.*, 2007). On rakkudele toksiline (Zhou *et al.*, 2011).

#### **1.2.1.3. mScarlet**

mScarlet on punane fluorestseeruv valk, kuid erinevalt oma eellasest, RFP-st, on mScarlet monomeerne valk ning on käesoleva ajani kõige tugevamini helendav punane valk. Valgu neeldumismaksimum on 569 nm juures ning emissioonimaksimum 594 nm juures. (Bindels *et al.*, 2017)

#### **1.2.1.4. mCerulean**

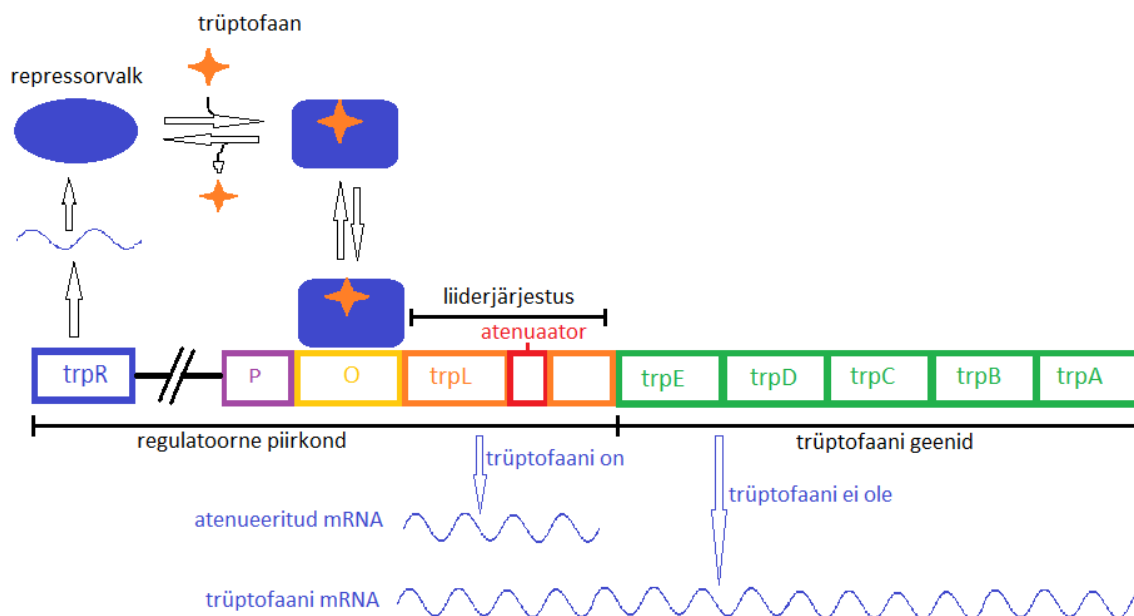
mCerulean on tsüaansinine monomeerne (Rizzo *et al.*, 2006) fluorestseeruv valk, mille ergastusmaksimum on 433 nm juures ning emissioonimaksimum 475 nm juures (Shaner *et al.*, 2005) Nendel lainepikkustel on *E. coli* autofluorestsentsi haripunkt ("Autofluorescence of

Bacteria”). Rakkude peamised autofluorestsentsi allikad on NADH ning flaviinid (Aubin, 1979). NADH ja flaviinid omavad oksüdeerunud ning redutseerunud vormis erinevat fluorestsents-spektrit (Ince *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2012). NADH ja flaviinid on olulised rakkudele kaitses oksüdatiivse stressi eest (Miller *et al.*, 1990). Antibiootikumid võivad põhjustada oksüdatiivset stressi (Kohanski *et al.*, 2007), seetõttu võib nende kasutamisel tekkida muutus autofluorestsentsis ja see muutus ei ole seotud reporteri toimega.

### 1.2.2. *trp*-operon

Transkriptsiooni reportereid on küllaltki lihtne disainida ja rakendada *in vivo* ja kuna bakterid adapteeruvad keskkonnaga peamiselt läbi transkriptsiooni regulatsiooni, siis sellised reporterid signaliseerivad küllaltki hästi keskkonnamuutusi (Campbell-Valois ja Sansonetti, 2014).

Trüptofaani *trp*-operon koosneb viiest geenist (*trpE*, *trpD*, *trpC*, *TrpB*, *trpA*) (Joonis 3), mida transkribeeritakse koos trüptofaani sünteesiks (Yanofsky, 1971). Lisaks on operonis regulatoorne piirkond *trpL* (Bertrand *et al.*, 1976). Trüptofaani esinemisel keskkonnas seondub *trpR* geenilt sünteesitud repressor operoniga ja takistab transkriptsiooni ning trüptofaani puudumisel toimub transkriptsoon (Bennett ja Yanofsky, 1978).



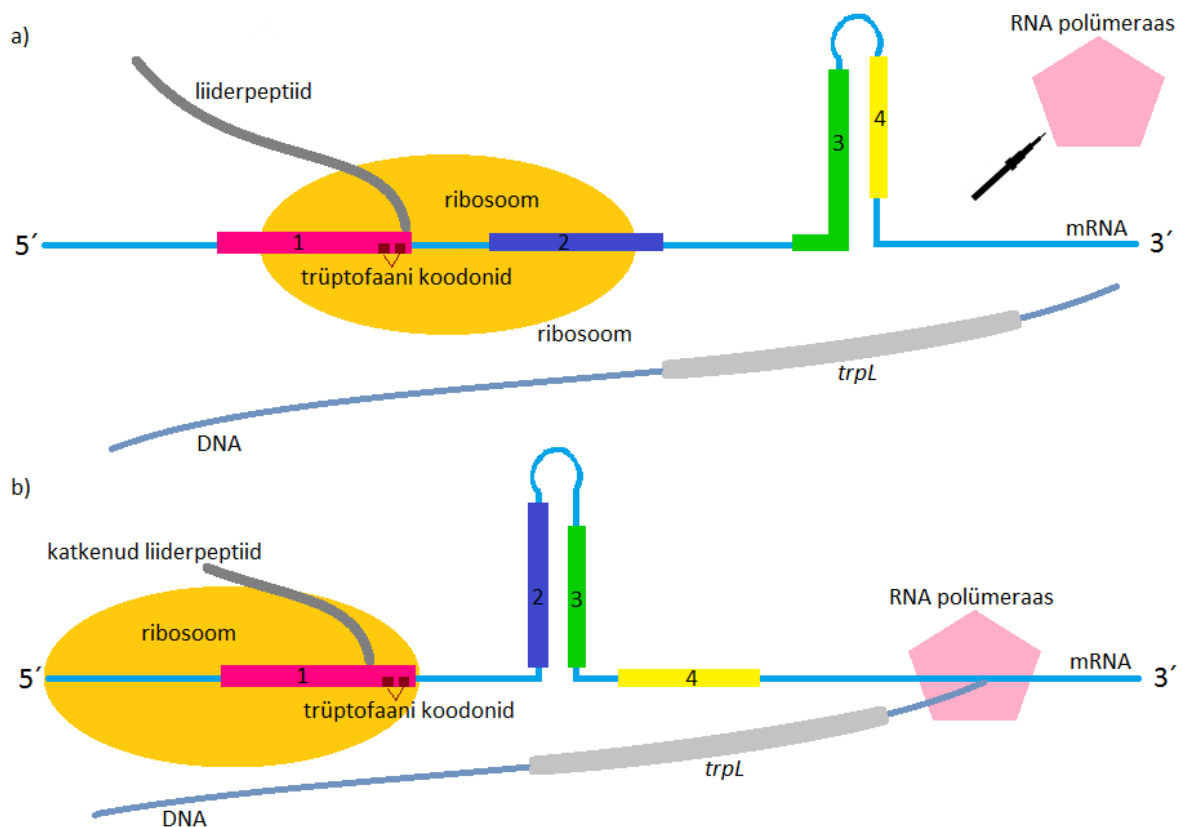
**Joonis 3.** *E. coli* trüptofaani operon. *trp*-operon koosneb viiest struktuurigeenist (*trpE*, *trpD*, *trpC*, *TrpB*, *trpA*) ja liiderjärjestustest *trpL*. O – operaatorpiirkond, P – promootorpiirkond, *trpR* – regulaatorgeen.

*trp*-operoni kontrollitakse lisaks transkriptsiooni represseerimisele ka 140 aluspaari pikkuse *trpL* liiderjärjestuse kaudu, mis kontrollib atenuatsiooni. Liiderjärjestuselt sünteesib ribosoom 14-st aminohappest koosneva liiderpeptiidi milles on kõrvuti kaks trüptofaani koodonit (Joonis 4). Samuti on selles liiderjärjestuses neli piirkonda, tähistatud 1-4 joonisel 4, mis võivad moodustada juuksenõelastruktuure. Omavahel võivad paarduda kas piirkonnad number 1 ja 2 ning 3 ja 4 või 2 ja 3. (Lee ja Yanofsky, 1977)

Juuksenõelastruktuur 3 ja 4 on sarnane bakterite transkriptsiooni terminatsiooni järjestusele ehk sisaldab G:C rikkaid palindroomseid järjestusi millele järgneb A:T rohke järjestus (Lee ja Yanofsky, 1977).

Kui keskkonnas on trüptofaaniga seotud tRNA-sid ehk keskkonnas on trüptofaani, siis jätkub translatsioon kahelt trüptofaani koodonilt ning moodustub juuksenõelastruktuur piirkondade 3 ja 4 vahel, mis peatab RNA polümeraasi (Lee ja Yanofsky, 1977).

Kui trüptofaan keskkonnast puudub, siis peatub translatsioon kahel trüptofaani koodonil ning paarduvad piirkonnad number 2 ja 3 ning ei moodustu transkriptsiooni termineerivat juuksenõelastruktuuri ja operoni transkriptsioon jätkub (Lee ja Yanofsky, 1977).



**Joonis 4. *trp*-operoni mehhanism. a)** Trüptofaani külluses täidetakse tRNA abil trüptofaani koodonid ning translatsioon jätkub. Paarduvad piirkonnad nr 3 ja 4, mis tekitab transkriptsiooni atenuatsioonisignaali. **b)** Trüptofaani puudumisel rakus peatub translatsioon kahel trüptofaani koodonil ning paarduvad piirkonnad 2 ja 3. Sellisel juhul ei teki transkriptsiooni termineerivat signaali ning operoni transkriptsioon jätkub.

### 1.3. Bioreporterite kasutusala

Bakterid on väga tihedalt keskkonnaga seotud ning väiksemgi muutus mõjutab neid (Campbell-Valois ja Sansonetti, 2014). Bakterid on head bioreporterid, sest nad on tundlikud keskkonnamuutustele, neid on lihtne kultiveerida, bakterid kasvavad kiiresti, neil on kiire ainevahetus ja neid on lihtne geneetiliselt modifitseerida. Kasutatakse ka imetajarakke (Banerjee ja Bhunia, 2010). Rakulised biosensorid on head alternatiivid ensüüm-biosensorile, sest on odavamad ja stabiilsemad, ära jäävad tüütud puhastamised, rakke on lihtsam kasvatada ning neis on olemas juba kõik vajalikud kofaktorid (Park *et al.*, 2013).

Bioreportereid saab kasutada erinevateks otstarveteks ning need on tundlikumad (Stocker *et al.*, 2003) kui praegused füsiokokeemilised määramismeetodid. Baktereid on konstrueeritud, et nad tunneks ära saasteaineid keskkonnast (mullast, veest, õhust) ning signaliseeriks näiteks

arseeni (Joshi *et al.*, 2009; Stocker *et al.*, 2003; Trang *et al.*, 2005), ksüleen ja toluueni (Paitan *et al.*, 2004), plahvatusohtliku DNT-d (de las Heras *et al.*, 2008) ja ka inimpatogeeni *Pseudomonas aeruginosa* (Saeidi *et al.*, 2011). Veel on konstrueeritud baktereid, kes tunnevad ära kahte signaalmolekuli ning ka on loodud süsteeme, mis tunnevad ära paralleelselt kolme erinevat signaali (Wang *et al.*, 2013).

Väga oluline on ka, et toit ei oleks saastunud ega sisaldaks antibiootikumide jääke. Seetõttu on loodud biosensoreid toidus ebasoovitavate ühendite detekteerimiseks (Banerjee ja Bhunia, 2010; Virolainen *et al.*, 2008). Teine suur kasutusala on reovee puhtuse kontroll. Näiteks on loodud biosensorid fenoolsete ühendite ning nitraadi ja nitriti tuvastamine reoveest (Abd-El-Haleem *et al.*, 2007; Wiles *et al.*, 2003).

Bioreporterite kasutamise eelis füsiokokeemiliste meetodite ees on nende kõrgem tundlikkus. Bioreporterid on väga spetsiifilised ja tunnevad oma tuvastatava aine ära ka madala kontsentratsiooniga ainete segust. Need on kiire vastusega, odavamad, spetsiifilised, vajavad väiksemat proovi kogust ning nende andmeid on lihtsam töödelda. Samuti ei vaja need proovi ettevalmistamist ega nõua spetsialiseeritud inimesi. (Bahadır ja Sezgintürk, 2015; Hajek *et al.*, 2016; Reder-Christ ja Bendas, 2011) Bioreporterid mõõdavad ainult bioloogiliselt olulist või kättesaadavat fraktsiooni ning suudavad arvesse võtta kogu segu mõju rakule ning vastavalt sellele signaliseerida (van der Meer ja Belkin, 2010).

### **1.3.1. Bioreporterite kasutamine antibiootikumidega**

Rakke, mis sisaldavad reportersüsteeme, mis on spetsiifiliselt mõjutatavad läbi selekteeritud promootorite, kasutatakse farmaatsiatööstuses ravimite väljatöötamisel ja keskkonnabioloogias. Neid kasutatakse sõeluuringus uute ravimikomponentide leidmisel ning bioaktiivsete ühendite detekteerimisel keskkonnaproovidest. (Urban *et al.*, 2007)

Lisaks uute antibiootikumsihtmärkide leidmisele, on väga oluline toota ka uusi ühendeid, mis suudaksid vältida tekkinud resistentsusmehhanisme. Veel tuleb piirata ebamõistlikku antibiootikumide kasutamist. (Reder-Christ ja Bendas, 2011)

Biosensorid on kõige paljulubavamad vahendid, et tuvastada antibiootikumide seondumiskohti (Reder-Christ ja Bendas, 2011).

Suurem enamus biosensoritest, mida antibiootikumide vallas kasutatakse, detekteerivad antibiootikume keskkonnas ning väiksem osa sensoritest kasutatakse selleks, et aru saada antibiootikumide mehhanismist (Reder-Christ ja Bendas, 2011).



Väga perspektiivikas on ka areneva tehnoloogia valguses *in situ* bakterite uurimine. Näiteks saaks uurida, kuidas antibiootikumravi edeneb juba infektsiooni käigus. Sellest paremini arusaades on võimalik täiustada antibiootikumravi (erinevad kombinatsioonid antibiootikume, parem annustamise režiim) ning seeläbi ehk vähendada antibiootikumidele resistentsete tüvede levikut. (Campbell-Valois ja Sansonetti, 2014; Kogermann *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2012)

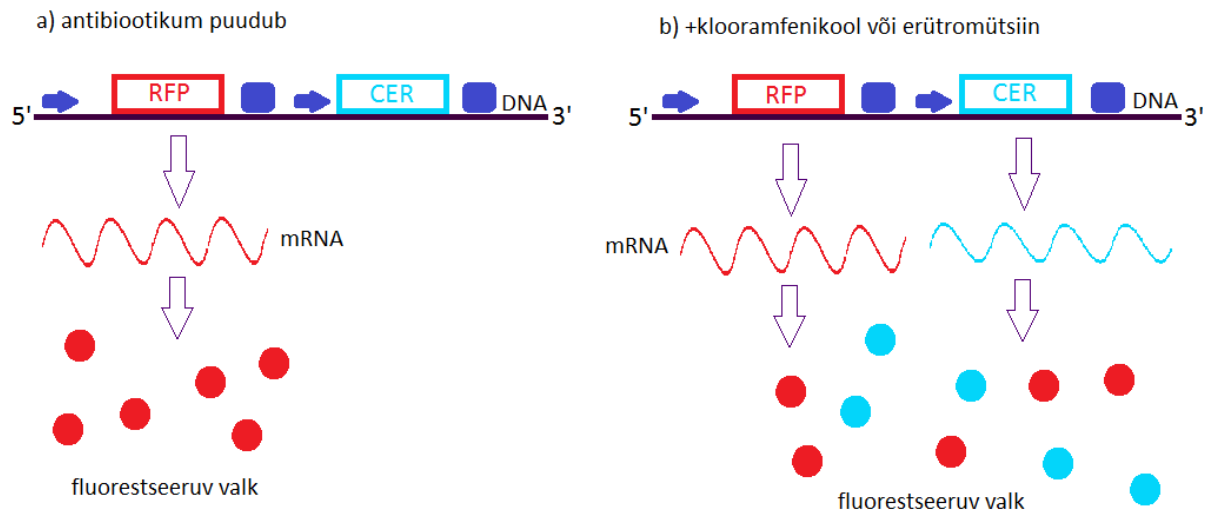
### 1.3.2. Atenuatsioonil põhinev CER-RFP-2Ala reporter

Atenuatsioonil põhinev CER-RFP-2Ala reporter sisaldab T5 faagi promootoreid, mis reguleerivad RFP (*red fluorescent protein* – punane fluorestseeruv valk) ja CER (*cerulean* – tsüaansinine fluorestseeruv valk) sünteesi (Joonis 5). Sünteesi alustanud RNA polümeraas lahkeb DNA ahelalt *rfp* geenile järgneva terminaatorjärjestuse tõttu. Terminaatorjärjestusele järgneb uus T5 faagi promootor, kuid enne *cer* geeni on *TrpL* liiderjärjestusest kaks trüptofaani koodonit asendatudalaniini koodonitega, et süntees poleks trüptofaanist sõltuv. Asendus on vaid ühe fluorestseeruva valgu ees, et teise valgu pealt saaks hinnata üldist valgusünteesi taset. Keskkonnas olevad antimikroobsed ühendid põhjustavad ribosoomi peatumist *trp*-operoni liiderjärjestuse 1. domeenis. See simuleerib trüptofaani madala taseme korral juhtuvat ning translatsioon ei saa jätkuda, kuid ribosoomi peatumise korral saab RNA polümeraas jätkata transkriptsiooni *cer* geenilt. Translatsiooni inhibitsiooni saab hinnata kõrge CER/RFP suhte järgi. (Osterman *et al.*, 2012)

Töös testiti reporterit erinevate ribosoomi tööd inhibeerivate antibiootikumidega, samuti kasutati kontrollina mitmeid antibiootikume, mis ei atakeeri ribosoomi. Töö autorid loodavad seda reporterit kasutada translatsiooni inhibeerivate ühendite leidmiseks. (Osterman *et al.*, 2012)

Tanel Tensoni uurimisgrupis on katsetatud Osterman *et al.* (2012) konstrueeritud bioreporterit erinevate antibiootikumidega, kuid töös ilmnes, et bakteripopulatsioonis on kaks alapopulatsiooni – üks alapopulatsioon ekspresseerib tugevalt fluorestseeruvaid valke, kuid teine alapopulatsioon ekspresseerib väga nõrgalt ehk populatsioon polnud homogeenne. (Schamardin, 2016)

Veel nähti, et mõlema valgu ergastus/emissioonispektris, eriti just mCerulean-il oli kõrge autofluorestsents (Schamardin, 2016). Samuti ilmnes, et TurboRFP on toksiline rakkudele, ka võib leida seda kirjandusest (Schamardin, 2016; Zhou *et al.*, 2011).



**Joonis 5. CER-RFP-2Ala reportersüsteem Osterman *et al.*, järgi. RFP – punane fluorestseeruv valk, CER – tsüaansinine fluoresteeruv valk, nooleke tähistab transkriptsiooni algust, ning ruuduke transkriptsiooni peatumist. a) Kui rakke pole töödeldud antibiootikumidega, siis toimub normaalne transkriptsiooni termineerimine ja rakud fluorestseeruvad vaid punaselt; b) kui rakke töödeldakse antibiootikumidega klooramfenikool või erütromütsiin, siis normaalne transkriptsiooni termineerimine on häiritud ning rakud on nii punased kui tsüaansinised.**

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Töö eesmärk oli konstrueerida bioreporter, mis signaliseerib fluorestseeruvate valkude abil ribosoomi aktiivsust (kas ribosoom on peatunud või mitte) antibiootikumi lisamisel keskkonda. Selline reporter oli juba olemas (Osterman *et al.*, 2012), kuid süsteemil ilmnemised mõned puudused. Nimelt ei olnud need bakteripopulatsioonid homogeenised ehk reporter pole kasutatav üksikraku tasemel. Samuti oli Ceruleani fluorestsentsispektris rakkudel kõrge autofluorestsents ning TurboRFP on toksiline rakkudele. (Schamardin, 2016)

Seepärast sai töö eesmärgiks konstrueerida uus transkriptsiooni atenuatsioonil põhinev antibiootikumi reporter, kasutades madala koopiaarvuga plasmidi ning fluorestseeruvaid valke GFP (ekspressioonitaseme kontrollvalk) ja mScarlet (reportervalk).

### 2.2. Materjal ja meetoodika

#### 2.2.1. Töös kasutatud tüved

Töös kasutati reportersüsteemi uurimisel *Escherichia coli* tüve MG1655. See on tavaline laboritüvi minimaalsete geneetiliste modifikatsioonidega (Blattner *et al.*, 1997). Tüves puudub F-plasmid ja  $\lambda$ -faag (Jensen, 1993).

Töös kasutati kloonimiseks mittepatoogeenset kompetentset *Escherichia coli* tüve DH5 $\alpha$ , mis on tavaline laboritüvi ("DH5-Alpha E.coli - microbewiki"). Mitmed mutatsioonid on teinud sellest tüvest kõrge transformatsiooniefektiivsusega tüve. *lacZ* Delta M15 mutatsiooni tõttu on võimalik teha sini-valge testi rekombinantsete rakkudega. *endA1* mutatsioon madaldab endonukleaasi aktiivsust, mistõttu suureneb transformatsiooniefektiivsus. *recA1* mutatsioon vähendab homoloogilist rekombinatsiooni, mistõttu suureneb inserdi stabiilsus. (Durfee *et al.*, 2008)

#### 2.2.2. Töös kasutatud söötmed

Tihti kasvatatakse rakke selektiivsel, ampitsilliini (100  $\mu\text{g/ml}$ ) sisaldaval söötmel, sest kasutatav plasmidiga tüvi on ampitsilliinile resistentne.

Töös kasutati firma BD™ Difco™ Lennox LB söödet, mis valmistati vastavalt tootja juhendile ja steriliseeriti. Vedelsööde steriliseeriti filtriga (põori diameeter 0,22  $\mu\text{m}$ ) ning agarsööde autoklaaviti. Vedelsööde filtreeriti, et tagada igal katsepäeval ühetaoline söötme

koostis, sest autoklaavimisel võivad aminohapped varieeruvast ulatuses laguneda. Valmis vedelsöödet säilitati 4 °C juures kuni 1 nädal.

Lennox LB söödet kasutati kompetentsete rakkude ning DMSO (dimetüülsulfoksiid) säilituskultuuri valmistamiseks.

Töös kasutati firma BD™ Difco™ MHB II söödet vedelal kujul, mis valmistati vastavalt tootja juhendile ja steriliseeriti filtriga (põõri diameeter 0,22 µm). Valmis söödet säilitati 4 °C juures kuni 1 nädal.

MHB II söödet kasutati mikrotiiterplaadilugeja katses.

### **2.2.3. Töös kasutatud antibiootikumid**

Ampitsilliin tehti pulbrist, lahustati Milli-Q vees, lõppkontsentratsiooniga 100 mg/ml. Antibiootikumi säilitati -20 °C juures.

Erütromütsiin (50 mg/ml) ja klooramfenikool (50 mg/ml), mõlemad lahustatud 96%-lises etanoolis, olid juba valmis tehtud ja säilitatud -20 °C juures.

### **2.2.4. Töös kasutatud praimerid ja plasmiidid**

Töös kasutatud praimerite nimed ja järjestused on toodud tabelis 1. Konstrueeritud plasmiidid ning doonorplasmiidid on toodud tabelis 2 (Lisa 1).

Plasmiidides kasutatakse trüptofaani operoni regulaatorala geeni *trpL* sensorina translatsiooni efektiivsuse määramiseks, kuid kaks trüptofaani koodonit on asendatudalaniini koodonitega, et konstrueeritav reporter poleks sõltuvuses trüptofaani olemasolust rakus. Ühes konstrueeritud reporterplasmiidis jääb kahe fluorestseeruva valguga geeni vahele vaid modifitseeritud *trpL* regulaatorala (pSC101\_GFP\_trpL2Ala\_mScarlet, ka lühendiga „trpL“). Teises konstrueeritud reporterplasmiidis jääb kahe fluorestseeruva valguga vahele terminaatorjärjestus, bakteriofaagi T5 promootor ning modifitseeritud *trpL* regulaatorala (pSC101\_GFP\_term\_trpL2Ala\_mScarlet, ka lühendiga „T5-trpL“) (Osterman *et al.*, 2012) GFP ees on nii konstitutiivne tet-promootor kui ka dnak-promootor.

Tavatingimustel tekib ainult GFP järjestust sisaldav mRNA ja rakud fluorestseeruvad roheliselt. Ribosoomi peatumisel *trpL* regulaatoralas transkribeeritakse ka mScarleti mRNA ja tekib ka punane fluorestsents. mScarleti ja GFP suhte alusel on võimalik hinnata reportersignaali.

**Tabel 1. Töös kasutatud praimerid**

Nimi	Järjestus	Inserdi/vektori praimer
GFPend	TGGCGGTTATTTGTACAATTCATCCATACC	Vektori praimer 1
Scarlet_start	GGAACAATATGGTGAGCAAGGGC	Vektori praimer 2
Term_trpL-GFPend	GGTATGGATGAATTGTACAAATAACCGCC ACCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAAT	Inserdi praimer 1
trpL_up-GFPend	GGTATGGATGAATTGTACAAATAACCGCC ACCGCGGAAGTTCACGTAAAAAGG	Inserdi praimer 2
trpL_down-Scarlet_start	GCCCTTGCTCACCATATTGTTCCCGGCAAT ACACTGCCCCG	Inserdi praimer 3

**Tabel 2. Töös kasutatud plasmiidid**

Plasmiid	Iseloomustus	Allikas
pSC101_GFP_term_trpL2Ala_mScarlet (ka lühendiga „T5-trpL“)	Sisaldab kahe fluorestseeruva valgu (GFPmut2 ja mScarlet) vahel T5 promootorit ja <i>trpL</i> liiderjärjestust.	Käesolev töö
pSC101_GFP_trpL2Ala_mScarlet (ka lühendiga „trpL“)	Sisaldab kahe fluoresteeruva valgu (GFPmut2 ja mScarlet) vahel <i>trpL</i> liiderjärjestust.	Käesolev töö
2Ala_CER_RFP_TrpL	Sisaldab T5 promootorit ja <i>trpL</i> liiderjärjestust.	(Osterman <i>et al.</i> , 2012)
pSC101_GFPmut2_mScarletWT (ka lühendiga „wt“)	Sisaldab kahte fluorestseeruvat valku (GFPmut2 ja mScarlet).	Mariliis Hinno

### 2.2.5. Kompetentsete rakkude valmistamine

Kompetentsete rakkude valmistamiseks võeti *Escherichia coli* tüve DH5α rakud säilituskultuurist, plaaditi LB-agariga Petri tassile üksikkolooniateks ning jäeti üleöö kasvama

37 °C juurde. Järgnevalt võeti üks kasvanud kolooniatest ning pandi kasvama 3 ml LB-ga katseklaasi, kasvatati loksutis Sanyo OrbiSafe kiirusel 220 rpm, temperatuuril 37 °C üleöö. Seejärel tehti 50x lahjenduskülv LB-ga 250 ml kolbi, kuhu lisati 25 ml söödet ning 0,5 ml üleöö kasvatatud bakterirakke. Rakke kasvatati eelpool nimetatud loksutis, kuni optiline tihedus 600 nm lainepikkusel oli ligikaudu 0,4. Seejärel pandi kolvid jääle ning jahutati 10 minutit. Jahutatud rakud tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga „Eppendorf MiniSpin“ 3000 g 10 minutit. Pärast tsentrifuugimist eemaldati sööde ning lisati 20 ml lahust RF1 (Tabel 3). Suspendeeriti hoolikalt ning hoiti jääl 15 minutit. Tsentrifuugiti taas ning valati pealt ära supernatant ning lisati 2 ml lahust RF2 (Tabel 4) ning suspendeeriti. Hoiti 15 minutit jääl ning seejärel pipeteeriti 100 µl kaupa tuubidesse jääle. Külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80 °C juures. (“RbCl competent cell - OpenWetWare”)

**Tabel 3. RF1 koostis 100 ml jaoks** (“RbCl competent cell - OpenWetWare”)

Koostisosa	Kogus	Kontsentratsioon
Rubiidiumkloriid (RbCl)	1,21 g	100 mM
Mangaan(II)kloriid tetrahüdraat (MnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0,99 g	50 mM
Kaaliumatsetaat	0,294 g	30 mM
Kaltsiumkloriid dihidraat (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0,148 g	10 mM
Glütserool	15 g või 12 ml	15% wt/vol

pH 5,8 saavutamiseks kasutada 0,2 M äädikhapet.

**Tabel 4. RF2 koostis 50 ml jaoks** (“RbCl competent cell - OpenWetWare”)

Koostisosa	Kogus	Kontsentratsioon
MOPS	0,105 g	10 mM
Rubiidiumkloriid (RbCl)	0,06 g	10 mM
Kaltsiumkloriid dihidraat (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0,55 g	75 mM
Glütserool	7,5 g või 6 ml	15% wt/vol

pH 6,8 saavutamiseks kasutada 1 M naatriumhüdroksiidi.

### 2.2.6. Kloonimine

Katses kasutatavate plasmiidide saamiseks disainiti programmiga SnapGene (versioon 4.0.4) praimerid nii, et saaks plasmidi kokku sünteesida kahe valmis PCR produkti põhjal CPEC (*Circular polymerase extension cloning* – tsirkulaarne polümeraas-ekstensioonkloonimine) (Quan ja Tian, 2011) meetodit kasutades. Meetod põhineb komplementaarsete üleulatuvate otstega praimeridisainil, mille tulemusena toodetakse esmalt PCR-il lineaarsed produktid ning

seejärel teise etapina toimub CPEC, mille ajal toimub insertide sisestamine vektorisse ning tsirkulaarse plasmidi moodustamine. Insertide ja praimerite otsad on tänu eelnevale praimeridisainile komplementaarsed ja toimivad CPEC reaktsioonis sisuliselt praimerina. Praimerid telliti firmast Metabion (Tabel 1).

Esmalt paljundati plasmidi osi, kasutades PCR meetodit. PCR segu koostis on toodud tabelis 5 ning PCR programmi parameetrid tabelis 6. Eraldi amplifitseeriti vektor (pikkusega 5583 aluspaari) ja inserdid (pikkustega 294 aluspaari ning 149 aluspaari).

**Tabel 5. PCR segu lõppkogusega 50 µl.**

Koostisosa	Kogus
5x HF Buffer	10 µl
dNTP segu (2mM)	5 µl
Polümeraas Phusion (2 U/µl) (Thermo Scientific)	0,5 µl
Praimer 1 (100 µM)	2,5 µl
Praimer 2 (100 µM)	2,5 µl
Plasmid (1-10 ng/µl)	0,5 µl
Vesi	29 µl

**Tabel 6. PCR programmi parameetrid.**

Tsükkel	Ahelate lahtisulamine	Praimerite kinnitumine	DNA süntees*
1. tsükkel	98 °C, 2 min	63 °C, 30 sek	72 °C, 1,5 min
2. – 31. tsükkel	98 °C, 30 sek	63 °C, 30 sek	72 °C, 1,5 min
32. tsükkel	98 °C, 30 sek	63 °C, 30 sek	72 °C, 5 min

\*DNA sünteesiti kiirusel 15 s/kb.

Geelelektroforeesi abil kontrolliti PCR-i tulemust. Selleks tehti 1%-line agarooosi geel: 1 g agarooosi, 100 ml 1xTAE puhvrit, 10 µl etiidumbromiidi. PCR proovidesse lisati 10 µl laadimisvärvi, et visualiseerida geelil DNA liikumist. Geelile kanti laadimisvärvi ja PCR produkti segu, 30 µl igasse hambasse. Geelelektroforeesi geelist eraldati vajaliku pikkusega DNA fragmendid kasutades FavorPrep Gel/PCR Purification MiniKit-i protokoll. Seejärel mõõdeti puhastatud produktide kontsentratsioonid NanoDrop-iga.

Viimaseks sooritati CPEC (Quan ja Tian, 2011), et saada valmis plasmid. CPEC-i segu koostis on toodud tabelis 7 ning programmi parameetrid tabelis 8.

**Tabel 7. CPEC-i segu segu lõppkogusega 20 µl.**

Koostisosa	Kogus
Phusion HF puhver	4 µ
dNTP segu 2mM	2 µl
Polümeraas	0,2 µl
Vektor	2,5 - 6 µl
Insert	4 – 6 µl
Vesi	Kuni 20 µl

**Tabel 8. CPEC-i programmi parameetrid.**

Tsükkel	Ahelate lahtisulamine	Fragmentide paardumine	DNA süntees*
1. tsükkel	98 °C, 30 sek	70 °C – 55 °C 30 sek, 3 min	72 °C, 88 sek
2. – 31. tsükkel	98 °C, 10 sek	70 °C – 55 °C 30 sek, 3 min	72 °C, 88 sek
3. tsükkel	98 °C, 10 sek	70 °C – 55 °C 30 sek, 3 min	72 °C, 5 min

\*DNA sünteesiti kiirusel 15 s/kb.

Seejärel sooritati CPEC-i reaktsiooni produktiga transformatsioon.

### 2.2.7. Transformatsioon

Transformatsiooniks võeti 7 µl CPEC-i reaktsiooni produkti ning lisati see 100 µl-le *E. coli* tüve DH5α kompetentidele jääl. Inkubeeriti tuube 30 min jääl. Tehti kuumašokk 45 s 42 °C inkubaatoris „Eppendorf Thermomixer compact“. Seejärel pandi tagasi jääle ning jahutati ligikaudu 10 minutit kuniks inkubaatori temperatuur langes 37 °C-ni. Tuubi lisati 900 µl LB söödet ning jäeti inkubaatorisse „Eppendorf Thermomixer compact“ 37 °C juurde 60-ks minutiks inkubeerima, loksutades 225 rpm. Seejärel tsentrifuugiti 30 sek maksimaalsel kiirusel (13,2 x 1000 rpm) ning võeti pealt suurem osa vedelikust ära. Ülejäänud plaaditi LB-tassidele ning jäeti üleöö kasvama 37 °C kappi.

Koloonia edasikülvamiseks valiti välja positiivse fluorestsentsi järgi, mis tehti kindlaks kasutades Fluoro/phosphoimager Typhoon Trio W/Workstation masinat. Rohelise fluorestseeruva valguga ergastamiseks kasutati laserit 488 ning mõõdeti emissiooni 526 nm



juures. Punase fluorestseeruva valguga ergastamiseks kasutati laserit 532 nm ning emissiooni mõõdeti 610 nm juures.

DH5 $\alpha$ -st eraldati plasmiid komplektiga FavorPrep Plasmid Extraction MiniKit. Seejärel transformeeriti puhastatud plasmiid *E. coli* tüvesse MG1655.

### **2.2.8. DMSO säilituskultuur**

Üleöö AMP-iga (antibiootikum ampitsilliin) (100  $\mu$ g/ml) LB söötmes kasvanud plasmidi sisaldavast MG1655 kultuurist tehti lahjendused, et OD<sub>600</sub> oleks 0,05. Seejärel kasvatati rakke kuni OD<sub>600</sub> oleks 0,6-0,8. Tehti 8%-lised DMSO säilituskultuurid. Võeti 120  $\mu$ l DMSO lahust ning 1380  $\mu$ l bakterirakke. Seejärel jaotati 120  $\mu$ l kaupa laiali ning pandi -80 °C külmkappi.

### **2.2.9. Voolutsütomeeter**

Enne katse sooritamist antibiootikumidega kontrolliti rakke voolutsütomeetriga. Kasutati masinat BD LSR Fortessa<sup>TM</sup> ning programmi BD FACSDiva Software 6.2.

DMSO säilituskultuuridest tehti 100X lahjendused 3 ml LB-sse ning lasti üleöö kasvada 37 °C juures. Järgmisel päeval tehti kõigepealt 10x lahjendus 1X fosfaatpuhvri (PBS) lahusesse. Seejärel fikseeriti 15 minutit 2%-lise formaldehüüdiga. Sellest tehti PBS-i 50x lahjendus, et rakkude lõppkontsentratsioon oleks ligikaudu 10<sup>6</sup> CFU/ml. Rakke analüüsiti kasutades masinat BD LSR Fortessa<sup>TM</sup> ning programmi BD FACSDiva Software 6.2. Rohelise fluorestseeruva valguga ergastamiseks kasutati laserit „Blue laser 488“ ning mõõdeti emissiooni 530 nm juures. Punase fluorestseeruva valguga ergastamiseks kasutati laserit „YG laser 561“ ning emissiooni mõõdeti 610 nm juures.

### **2.2.10. Mikrotiiterplaadilugeja katse**

Mikrotiiterplaadi jaoks kasvatati rakke ette 100 ml kolbides. Kolbidesse lisati: DMSO säilituskultuuri 100  $\mu$ l, antibiootikumi AMP 100mg/ml 10  $\mu$ l ja MHB söödet 10 ml. Kasvatamine viidi läbi 2 h jooksul Sanyo OrbiSafe loksutis kiirusel 220 rpm, temperatuuril 37 °C. Rakkude eksponentsiaalse faasi saabumisel pandi mikrotiiterplaadi kannu 50  $\mu$ l MHB söödet (koos vastava antibiootikumiga) ning 50  $\mu$ l rakke.

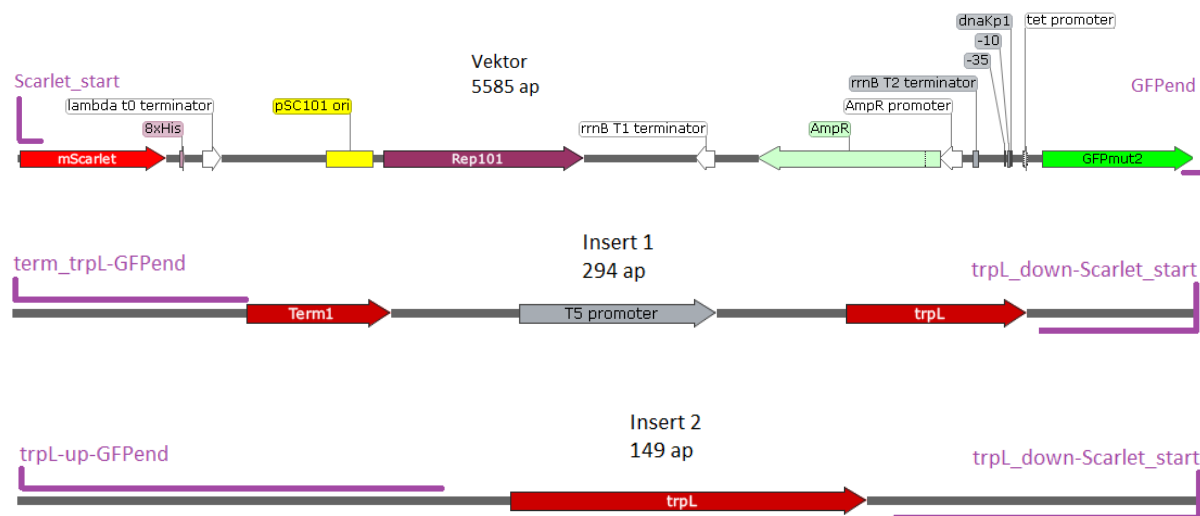
Katses kasutati 96-kohalist mikrotiiterplaati kaanega. Kõikidest tüvedest tehti iga antibiootikumi kontsentratsiooniga kolm kordust. Katses kasutati antibiootikume klooramfenikool kontsentratsioonidel 0,5, 1 ja 2  $\mu$ g/ml ning erütromütsiin kontsentratsioonidel 20 ja 40  $\mu$ g/ml. Samuti oli negatiivseks kontrolliks ilma antibiootikumideta kannud.

Mikrotiiterplaat pandi 22-ks tunniks BioTek SynergyMX mikroplaadi lugejasse. Lugeja oli seadistatud 37 °C juurde ja loksutuskiirus oli keskmine. Mõõtmised toimusid iga 15 minuti järel. Mõõdeti optilist tihedust 600 nm juures; GFP-d ergastati 480,5-489,5 nm juures ja mõõdeti emissiooni 505,5-514,5 nm juures tundlikkusega 80 (inglise keeles: *gain*); mScarlet-  
it ergastati 562,25-575,75 nm juures ja mõõdeti emissiooni 591,5-608,5 nm juures tundlikkusega 100.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Reporterplasmiidide konstrueerimine

PCR-iga paljundati järgmiste praimeritega lõike järgmistes plasmiidides (Tabel 1): praimeritega GFPend ja Scarlet\_start paljundati plasmidi pSC101\_GFPmut2\_mScarletWT (edaspidi vektor); praimeritega term\_trpL\_GFPend ja trpL\_down\_Scarlet\_start paljundati inserti plasmiidilt 2Ala\_CER\_RFP-trpL (edaspidi: insert 1); praimeritega trpL\_down\_Scarlet\_start, trpL\_up\_GFPend paljundati inserti plasmiidilt 2Ala\_CER\_RFP\_trpL (edaspidi: insert 2) (Joonis 6). Terviklikud plasmiidikaardid on toodud Lisa 1.



**Joonis 6. Vektor plasmiidist pSC101\_GFPmut2\_mScarletWT ja inserdid plasmiidist 2Ala-CER. Töö käigus konstrueeriti kaks plasmidi: vektor + insert 1 ning vektor + insert 2.**

CPEC-i käigus ühendati plasmiidide osad (vektor ja insert) ühtseteks plasmiidideks. Plasmidi trpL jaoks lisati 2,5 µl 8,4 ng/µl vektorit ning 6 µl 30,4 ng/µl inserti 1. Plasmidi T5-TrpL jaoks lisati 6 µl 8,4 ng/µl vektorit ning 4 µl 17,1 ng/µl inserti 2. Plasmiidikaardid on Lisa 1.

CPEC-i produkti transformatsioon *E. coli* tüvesse DH5 $\alpha$  oli edukas ning sellest võib järeldada, et ka CPEC oli edukas (Lisa 2).

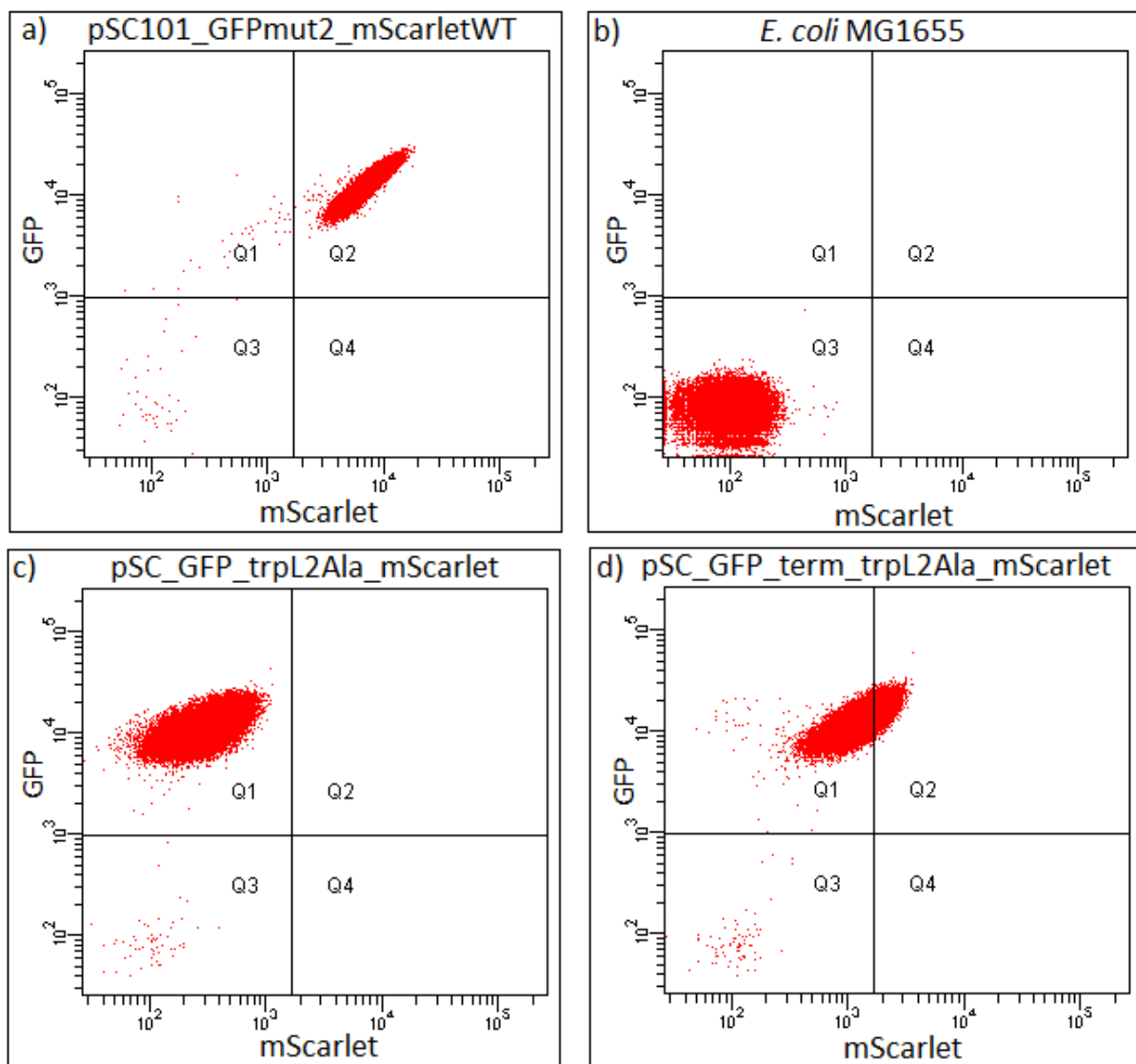
### **2.3.2. Reporterplasmiidide kontrollimine *E. coli* tüve MG1655 rakkudes**

Plasmidi puhastamiseks valiti kontrollvalku GFP-d ekspresseerivad kolooniad fluorestsentsi järgi kasutades masinat Fluoro/phosphoimager Typhoon Trio W/Workstation ning GFP ergastamiseks kasutati laserit 488 ning mõõdeti emissiooni 526 nm juures. Seejärel tehti transformatsioon *E. coli* tüvesse MG1655.

Enne katsete tegemist kontrolliti taaskord GFP ekspressiooni olemasolu samadel tingimustel ning tehti neist säilituskultuurid (Lisa 3).

Voolutsütomeetriga vaadati *E. coli* rakke, millesse oli viidud reporterplasmiid. Sellega taheti kontrollida, kas kultuurid on homogeensed. Selleks analüüsiti fikseeritud kultuuris mõlemat konstrueeritud plasmidi (pSC101\_GFP\_term\_trpL2Ala\_mScarlet ja pSC101\_GFP\_trpL2Ala\_mScarlet) ekspresseerivad MG1655 rakud ning positiivseks kontrolliks nii GFP-d kui mScarlet-it ekspresseerivad rakud MG1655 plasmiidiga pSC101\_GFPmut2\_mScarletWT, umbes 10<sup>6</sup> CFU/ml, lastes neid läbi masina kõige aeglasema voolukiirusega. Negatiivseks kontrolliks olid ilma plasmiidita MG1655 tüve rakud.

Voolutsütomeetri katsest selgus, et kultuurid on homogeensed (Joonis 7) ning mindi edasi mikrotiiterplaadilugeja katse juurde.

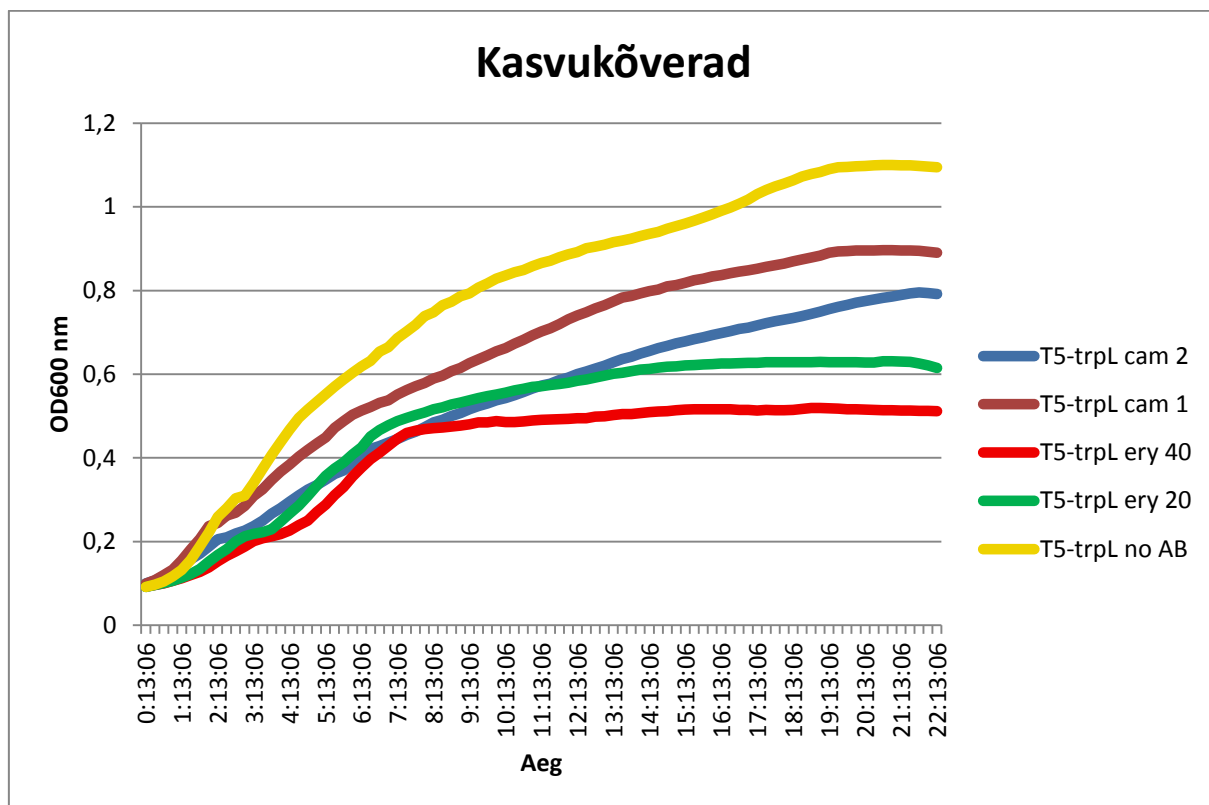


**Joonis 7. Voolutsütomeetri katse tulemused. GFP signaali mõõdeti vahemikus 515-545 nm, mScarleti signaali mõõdeti vahemikus 600-620 nm. MHB söötmes üleöö kasvanud kultuurid. a) positiivne kontroll *E. coli* MG1655 koos plasmiidiga pSC101\_GFPmut2\_mScarletWT, b) negatiivseks kontrolliks plasmiidita *E. coli* MG1655 bakterid, c) *E. coli* MG1655 koos plasmiidiga pSC101\_GFP\_trpL2Ala\_mScarlet, d) *E. coli* MG1655 koos plasmiidiga pSC101\_GFP\_term\_trpL2Ala\_mScarlet. Kultuurid on homogeensed, ei esine alapopulatsioone.**

### 2.3.3. Reporterplasmiidide kontrollimine antibiootikumidega

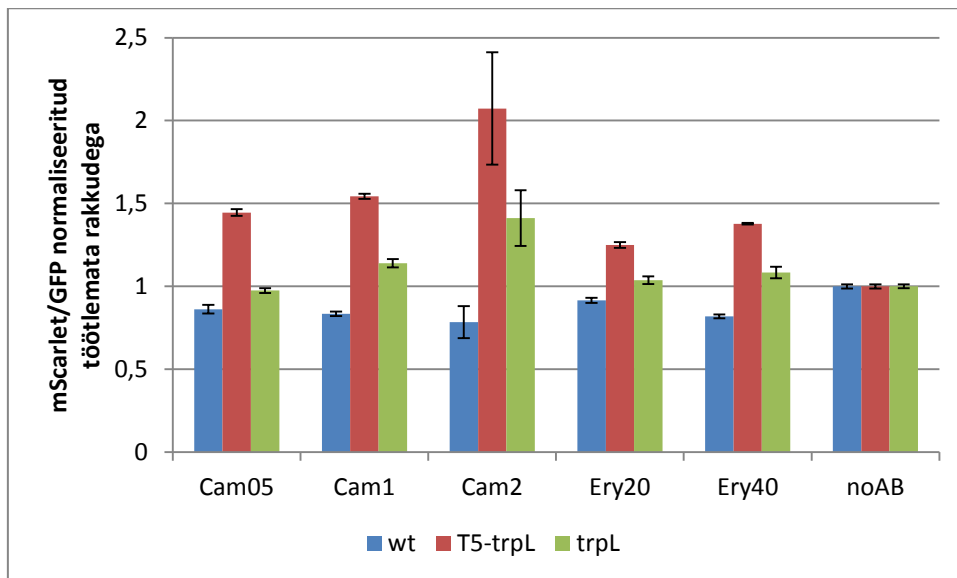
Mikrotiiterplaadilugeja katsega taheti vaadata, kuidas antibiootikumid avaldavad bakterite kasvule mõju ning kuidas ekspresseeruvad fluorestseeruvad valgud. Mikrotiiterplaadilugejale pandi bakterid MHB söötmesse ning masin seati keskmise väristuskiirusega üleöö 37 °C juurde.

Katse tulemustest on näha, et valitud antibiootikumikontsentratsioonid sobisid, kuna avaldasid nähtavalt inhibeerivat toimet bakterite kasvule, kuna optiline tihedus kasvas antibiootikumide juuresolekul aeglasemalt, võrreldes ilma antibiootikumita prooviga, ning lõpp-OD on samuti madalam (Joonis 8).



**Joonis 8. Kasvukõverad OD<sub>600</sub> nm juures mikrotiiterplaadilugejaga. Horisontaalteljel on näidatud aeg ning vertikaalteljel OD<sub>600</sub> nm juures. Rakud kasvasid MHB söötmes 37 °C juures. T5-trpL – *E. coli* rakud, millesse on viidud sisse plasmiid pSC101\_GFP\_term\_trpL2Ala\_mScarlet. Kasutatud antibiootikumide lühendid: Cam 1 ja 2 – klooramfenikool kontsentratsioon 1 ja 2 µg/ml. Ery 20 ja 40 – erütromütsiin kontsentratsiooniga 20 ja 40 µg/ml. Antud tingimustel avaldavad antibiootikumid kasvu pärssivat mõju.**

Lisaks optilisele tihedusele, millega hinnati kasvu, sai mõõdetud ka fluorestsentsi. Kuna fluorestsentsi tasemed on erinevate plasmiidide korral erinevad, nagu võib näha voolutsütomeetria katsest, siis tulemused normaliseeriti sama tüve antibiootikumita kultuuri suhtes. Need normaliseeritud tulemused on toodud joonisel 9.



**Joonis 9. Mikrotiiterpladilugeja katse mScarlet/GFP suhte normaliseeritud tulemused.** Joonisel on näidatud erinevate antibiootikumide kontsentratsioonide juures erinevate tüvede fluorestseerumine suhtes mScarlet/GFP ning tulbad on normaliseeritud töötlemata rakkudega. Tulpadele on lisatud kolme katse normaliseeritud standardhälve mScarlet/GFP. Kasutatud lühendid: Cam 05, 1 ja 2 – klooramfenikool kontsentratsioonis 0,5, 1 ja 2 µg/ml. Ery 20 ja 40 – erütromütsiin kontsentratsiooniga 20 ja 40 µg/ml. noAB – plasmiidiga rakud, millele pole lisatud antibiootikumi. Legend: wt – mScarletit konstitutiivselt ekspresseeriv *E. coli* tüvi plasmiidiga pSC101\_GFPmut2\_mScarletWT (positiivne kontroll), T5-trpL – *E. coli* plasmiidiga pSC101\_GFP\_term\_trpL2Ala\_mScarlet, trpL – *E. coli* tüvi plasmiidiga pSC101\_GFP\_trpL2Ala\_mScarlet.

Jooniselt 9 on näha, et lisapromootor plasmiidis T5-trpL mScarleti ees avaldab mõju mScarleti tootmisele antibiootikumi juuresolekul, selgelt eristub mScarlet/GFP suhe antibiootikumideta proovist.

Plasmidi wt mScarlet/GFP suhe antibiootikumi kontsentratsiooni tõstmisel väheneb, sest antibiootikumid inhibeerivad kogu valgusünteesi ning mScarlet on tõenäoliselt tundlikum antibiootikumile.

mScarlet/GFP suhte muutust antibiootikumi lisades võrreldes antibiootikumita proovist võib defineerida kui biosensori signaali tugevust.

Klooramfenikooli kontsentratsioonide 0,5, 1 ja 2 µg/ml korral on plasmidi trpL signaali tugevused vastavalt 0,98, 1,14 ja 1,41, plasmidi T5-trpL korral on need vastavalt 1,44, 1,54, 2,07 korda kõrgemad võrreldes ilma antibiootikumideta prooviga.

Erütromütsiini kontsentratsioonide 20 ja 40 µg/ml korral on plasmidi trpL signaali tugevused vastavalt 1,04 ja 1,08, plasmidi T5-trpL korral on need vastavalt 1,25 ja 1,38 korda kõrgemad kui ilma antibiootikumideta proovis.

Plasmiidiga trpL oli ainuke selgesti eristuv tulemus klooramfenikooli kontsentratsiooni 2 µg/ml korral – 41% signaalitugevuse kasvu. Teistel juhtudel olid muutused küllaltki väikesed: klooramfenikooli kontsentratsiooni 0,5 µg/ml korral 2% langeb mScarlet/GFP suhe, klooramfenikooli kontsentratsiooni 1 µg/ml korral on 14% kasvu, erütromütsiini kontsentratsiooni 20 µg/ml korral 4% kasvu ja erütromütsiini kontsentratsiooni 40 µg/ml juures 8% kasvu.

Plasmiidiga T5-trpL on tulemused paremini eristatavad: klooramfenikooli kontsentratsiooni 0,5 µg/ml korral 44% signaalitugevuse kasvu, klooramfenikooli kontsentratsiooni 1 µg/ml korral 54% kasvu, klooramfenikooli kontsentratsiooni 2 µg/ml korral 107% kasvu, erütromütsiini kontsentratsiooni 20 µg/ml korral 25% kasvu ja erütromütsiini kontsentratsiooni 40 µg/ml juures oli 38% kasvu.

Võrreldes kahe plasmidi tulemusi antibiootikumita prooviga siis on näha, et T5-trpL mScarlet/GFP suhe on suurem igal juhul, kuid erinevused on väiksemad erütromütsiini puhul. Veel on näha, et antibiootikumi kontsentratsiooni kasvades signaali tugevus kasvab.

Kirjeldatud tulemuste põhjal võib järeldada, et edaspidiseks kasutuseks sobib paremini plasmid, kus on lisapromootor ehk T5-trpL, kuid on vaja teha lisakatseid, suurendades antibiootikumide kontsentratsioonide valikut, et näha paremini mScarlet/GFP suhte muutumist ning katseid peaks tegema ka rohkemate antibiootikumidega, et näha, kuidas teiste ribosoomi inhibeerivate antibiootikumide korral reporter töötab.

## **2.4. Arutelu**

Tuginedes nii voolutsütomeetria katse tulemustele (Joonis 7) kui ka mikrotiiterplaadi katse tulemustele (Joonis 9), siis on näha, et lisapromootor plasmidis pSC101\_GFP\_term\_trpL2Ala\_mScarlet avaldab mõju mScarleti tootmisele. Jooniselt 9 on näha, et kasutades eraldi promootoriga plasmidi, on mScarlet/GFP suhe antibiootikumiga proovis paremini eristatav ilma antibiootikumita proovist. Enamike antibiootikumi kontsentratsioonide juures ei eristu plasmidi pSC101\_GFP\_trpL2Ala\_mScarlet mScarlet/GFP suhe antibiootikumideta proovist, välja arvatud klooramfenikooli kontsentratsiooni 2 ng/µl korral, mil signaalitugevus kasvas 41%, teistel juhtudel jäi see tunduvalt madalamale.

Erütromütsiini puhul on mScarlet/GFP suhe väiksem, see võib tuleneda asjaolust, et erütromütsiini kinnitumine ribosoomile pole väga tugev ning antibiootikum tuleb ribosoomi küljest lahti umbes sama kergelt nagu peptidüül-tRNA (Tenson ja Mankin, 2006). Samuti on molekul väga spetsiifilise ajastusega, nimelt seondub alles siis kui sünteesitav ahel on vähemalt viis aminohapet pikk ning kui sünteesitav ahel on üle kaheksa aminohappe pikk, siis antibiootikum enam ei mõjuta valgusünteesi (Tenson *et al.*, 2003).

Edasi tuleks voolutsütomeetriga uurida üksikrakke, kuna kogu populatsioonis võivad antibiootikumide juuresolekul olla alapopulatsioonid ja kultuur võib sisaldada surnud rakke, mis ei fluorestseeru, kuid mõjutavad optilist tihedust, mis segab reporteri signaali täpset detekteerimist. Samuti ei ole teada, kas antibiootikum läheb ühtlaselt kõikidesse rakkudesse või on populatsioonis ka selliseid rakke, mis on elus (ekspresseerivad GFP-d), aga kus mScarleti valgu tootmine pole tõusnud ehk ribosoom ei ole peatunud antibiootikumide toimel.

Taolise bioreporterit edasiarendusel tuleks lähtuda plasmiidist pSC101\_GFP\_term\_trpL2Ala\_mScarlet. Selleks tuleks konstrueerida uus kontrollplasmiid, mis erineks vaid puuduva modifitseeritud *trpL* järjestuse poolest, kuid sisaldaks terminaatorit ja promootorit kahe reportergeeni vahel. Sellise kontrollplasmiidiga välistame vähetõenäolise olukorra, kus T5 promootori tugevus sõltub antibiootikumi poolt põhjustatud stressist.

Konstrueeritud plasmidi sobivuse näitena võib ühe põhjusena välja tuua, et GFP ning mScarleti kasutamisel ei ilmnenud probleeme autofluorestsentsiga nagu tuli ilmsiks Schamardini töös. Samuti oli kultuur homogeensem võrreldes Schamardin-i tehtud tööga.

Plasmiidiga tuleks teha lisakatsetusi teiste antibiootikumidega ning kasutada rohkem erinevaid kontsentratsioone. Siiski on sellel bioreporteril potentsiaali tuvastamaks populatsiooni heterogeensust. Edasi võiks neid reportereid kasvatada antibiootikumi juuresolekul voolutsütomeetriga.



## KOKKUVÕTE

Töö eesmärgiks oli luua bioreporter, mis signaliseeriks fluorestseeruvate valkude abil ribosoomi seiskumist või mitteseiskumist antibiootikumide lisamisel keskkonda. Selline reporter oli juba olemas, kuid sel ilmneseid puudused, näiteks oli Ceruleani spektris kõrge bakterite autofluorestsents ning TurboRFP on toksiline bakteritele, andes kultuuris olulise heterogeensuse.

Antud töös konstrueeriti kaks plasmidi ning transformeeriti need *Escherichia coli* tüvesse MG1655. Üks plasmid sisaldas kahe fluorestseeruva valguga (GFP ja mScarlet) vahel lisaks *trpL* järjestusele selle ees ka konstitutiivset T5 promootorit. Mõlemad plasmidid pidid bakteris ekspresseerima iseseisvalt rohelist valku ning ribosoomi peatumisel (antibiootikumi lisamisel) ka punast valku.

Reporter töötas ning reporteri signaali määrati mScarlet/GFP suhte alusel, mida mõõdeti mikrotiiterplaadilugejaga ning rakupopulatsiooni homogeensust mõõdeti voolutsütomeetriga.

Edaspidi võiks lisakatseid teha plasmiidiga pSC101\_GFP\_term\_trpLAla\_mScarlet, sest see plasmid tõestas ennast paremini. mScarlet/GFP suhted olid tunduvalt suuremad kui plasmidi pSC101\_GFP\_trpLAla\_mScarleti korral.

# SUMMARY

## **Constructing a fluorescence-based bioreporter for detecting ribosome inhibiting antibiotics in bacterium *Escherichia coli***

Kadi Sagor

### Summary

Resistance of bacteria to antibiotics and therefore to treatment is a growing problem. Bacteria may acquire a resistance gene from the environment through transduction, transformation or conjugation. To stop the spread of resistance, it is necessary to use antibiotics reasonably, limit their veterinary use, remove antibiotics from the environment and create new antibacterial substances.

For the last two methods, it is possible to use biosensors. They detect antimicrobial substances from the environment and help to identify pollution and to detect possible new drugs.

Osterman *et al.* (2012) constructed a bioreporter based on two fluorescent proteins, but the experiments demonstrated some limitations of the bioreporter. The bacteria have high autofluorescence at the excitation/emission wavelengths used by Cerulean, one of the fluorescent proteins used by the sensor. TurboRFP, another fluorescent protein used by the sensor is toxic to the cells. Also, the population was heterogeneous.

In this study, two plasmids were constructed and inserted into *E. coli* strain MG1655. The plasmids contained two fluorescent proteins (mScarlet and GFP) with a modified *trp*-operon leader sequence in between. One of the plasmids contained an extra T5 promoter before the leader sequence.

Ribosome inhibiting antibiotics erythromycin (concentrations 20 and 40 ng/μl) and chloramphenicol (concentrations 0,5, 1 and 2 ng/μl) were used in the study. First, the homogeneity of the population was tested with flow cytometry and then the fluorescence intensities were measured with a microtiter plate reader.

The ratio of mScarlet/GFP was observed. From the results, it was found that the plasmid with the extra promoter worked better. In further studies, homogeneity of the bioreporter should be tested.

## KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Abd-El-Haleem, D., Ripp, S., Zaki, S., & Sayler, G. S. (2007). Detection of nitrate/nitrite bioavailability in wastewater using a luxCDABE-based *Klebsiella oxytoca* bioluminescent bioreporter. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(8), 1254–1261.
- Aubin, J. E. (1979). Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 27(1), 36–43. <https://doi.org/10.1177/27.1.220325>
- Bahadır, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2015). Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. *Analytical Biochemistry*, 478, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.011>
- Banerjee, P., & Bhunia, A. K. (2010). Cell-based biosensor for rapid screening of pathogens and toxins. *Biosensors & Bioelectronics*, 26(1), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.05.020>
- Bennett, G. N., & Yanofsky, C. (1978). Sequence analysis of operator constitutive mutants of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 121(2), 179–192.
- Bertrand, K., Squires, C., & Yanofsky, C. (1976). Transcription termination in vivo in the leader region of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 103(2), 319–337. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90315-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90315-6)
- Bindels, D. S., Haarbosch, L., van Weeren, L., Postma, M., Wiese, K. E., Mastop, M., ... Gadella, T. W. J. (2017). mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nature Methods*, 14(1), 53–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4074>
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., ... Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), 1453–1462.

- Campbell-Valois, F.-X., & Sansonetti, P. J. (2014). Tracking bacterial pathogens with genetically-encoded reporters. *FEBS Letters*, 588(15), 2428–2436. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.022>
- de las Heras, A., Carreño, C. A., & de Lorenzo, V. (2008). Stable implantation of orthogonal sensor circuits in Gram-negative bacteria for environmental release. *Environmental Microbiology*, 10(12), 3305–3316. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01722.x>
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., & Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 7(2), 725–737.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., ... Blattner, F. R. (2008). The Complete Genome Sequence of Escherichia coli DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2597–2606. <https://doi.org/10.1128/JB.01695-07>
- Džidić, S., Šušković, J., & Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 11–21.
- Fleming, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzæ. *British Journal of Experimental Pathology*, 10(3), 226–236.
- Gould, S. J., & Subramani, S. (1988). Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Analytical Biochemistry*, 175(1), 5–13. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90353-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90353-3)
- Gruber, T. M., & Gross, C. A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Review of Microbiology*, 57, 441–466. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090913>

- Hajek, K., Schmittlein, C., Oberleitner, M., Shin, I.-S., & Wegener, J. (2016). Biosensors. In *eLS* (pp. 1–12). American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0026401>
- Happi, C. T., Gbotosho, G. O., Folarin, O. A., Akinboye, D. O., Yusuf, B. O., Ebong, O. O., ... Oduola, A. M. J. (2005). Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps genes and age related in vivo sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. *Acta Tropica*, 95(3), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.06.015>
- Heim, R., Prasher, D. C., & Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), 12501–12504.
- Holmes, R. K., & Jobling, M. G. (1996). Genetics. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed.). Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7908/>
- Ince, C., Coremans, J. M. C. C., & Bruining, H. A. (1992). In Vivo NADH Fluorescence. In *Oxygen Transport to Tissue XIV* (pp. 277–296). Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3428-0\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3428-0_30)
- Jensen, K. F. (1993). The *Escherichia coli* K-12 “wild types” W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. *Journal of Bacteriology*, 175(11), 3401–3407.
- Joshi, N., Wang, X., Montgomery, L., Elfick, A., & French, C. E. (2009). Novel approaches to biosensors for detection of arsenic in drinking water. *Desalination*, 248(1), 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.05.096>
- Kogermann, K., Putrinš, M., & Tenson, T. (2016). Single-cell level methods for studying the effect of antibiotics on bacteria during infection. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95, 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.08.042>

- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5), 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>
- Kumar, A., & Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1486–1513. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004>
- Lambert, P. A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1471–1485. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.003>
- Lee, F., & Yanofsky, C. (1977). Transcription termination at the trp operon attenuators of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: RNA secondary structure and regulation of termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(10), 4365–4369. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.10.4365>
- Lovmar, M., Nilsson, K., Lukk, E., Vimberg, V., Tenson, T., & Ehrenberg, M. (2009). Erythromycin resistance by L4/L22 mutations and resistance masking by drug efflux pump deficiency. *The EMBO Journal*, 28(6), 736–744. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.17>
- Merzlyak, E. M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M. E., Shcheglov, A. S., Fradkov, A. F., ... Chudakov, D. M. (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nature Methods*, 4(7), 555–557. <https://doi.org/10.1038/nmeth1062>
- Miller, H., Poole, L. B., & Claiborne, A. (1990). Heterogeneity among the flavin-containing NADH peroxidases of group D streptococci. Analysis of the enzyme from *Streptococcus faecalis* ATCC 9790. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(17), 9857–9863.

- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., & Remington, S. J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5280), 1392–1395.
- Osterman, I. A., Prokhorova, I. V., Sysoev, V. O., Boykova, Y. V., Efremenkova, O. V., Svetlov, M. S., ... Dontsova, O. A. (2012). Attenuation-Based Dual-Fluorescent-Protein Reporter for Screening Translation Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 1774–1783. <https://doi.org/10.1128/AAC.05395-11>
- Paitan, Y., Biran, I., Shechter, N., Biran, D., Rishpon, J., & Ron, E. Z. (2004). Monitoring aromatic hydrocarbons by whole cell electrochemical biosensors. *Analytical Biochemistry*, 335(2), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.08.032>
- Pakhomov, A. A., & Martynov, V. I. (2008). GFP family: structural insights into spectral tuning. *Chemistry & Biology*, 15(8), 755–764. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.07.009>
- Park, M., Tsai, S.-L., & Chen, W. (2013). Microbial Biosensors: Engineered Microorganisms as the Sensing Machinery. *Sensors*, 13(5), 5777–5795. <https://doi.org/10.3390/s130505777>
- Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G., & Teuber, M. (1997). Antibiotic resistance spread in food. *Nature*, 389(6653), 801–802. <https://doi.org/10.1038/39767>
- Poehlsgaard, J., & Douthwaite, S. (2005). The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(11), 870–881. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1265>
- Quan, J., & Tian, J. (2011). Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nature Protocols*, 6(2), 242–251. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.181>
- Reder-Christ, K., & Bendas, G. (2011). Biosensor Applications in the Field of Antibiotic Research—A Review of Recent Developments. *Sensors*, 11(10), 9450–9466. <https://doi.org/10.3390/s111009450>

- Rizzo, M. A., Springer, G., Segawa, K., Zipfel, W. R., & Piston, D. W. (2006). Optimization of Pairings and Detection Conditions for Measurement of FRET between Cyan and Yellow Fluorescent Proteins. *Microscopy and Microanalysis*, 12(3), 238–254. <https://doi.org/10.1017/S1431927606060235>
- Saeidi, N., Wong, C. K., Lo, T.-M., Nguyen, H. X., Ling, H., Leong, S. S. J., ... Chang, M. W. (2011). Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 521. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.55>
- Sample, V., Newman, R. H., & Zhang, J. (2009). The structure and function of fluorescent proteins. *Chemical Society Reviews*, 38(10), 2852–2864. <https://doi.org/10.1039/b913033k>
- Schamardin, M. M. (2016). *Fluorescentsil põhineva antibiootikumi bioreporteritestimine bakteris Escherichia coli*. (Thesis). Tartu Ülikool. Retrieved from <http://dspace.ut.ee/handle/10062/52104>
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., & Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2(12), 905–909. <https://doi.org/10.1038/nmeth819>
- Shashkova, S., & Leake, M. C. (2017). Single-molecule fluorescence microscopy review: shedding new light on old problems. *Bioscience Reports*, 37(4). <https://doi.org/10.1042/BSR20170031>
- Shaw, W. V. (1967). The Enzymatic Acetylation of Chloramphenicol by Extracts of R Factor-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 242(4), 687–693.
- Shaw, W. V., & Unowsky, J. (1968). Mechanism of R factor-mediated chloramphenicol resistance. *Journal of Bacteriology*, 95(5), 1976–1978.
- Shemer, B., Palevsky, N., Yagur-Kroll, S., & Belkin, S. (2015). Genetically engineered microorganisms for the detection of explosives' residues. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01175>



- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(3), 434–452. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- Stepanenko, O. V., Verkhusha, V. V., Kuznetsova, I. M., Uversky, V. N., & Turoverov, K. K. (2008). Fluorescent Proteins as Biomarkers and Biosensors: Throwing Color Lights on Molecular and Cellular Processes. *Current Protein & Peptide Science*, 9(4), 338–369.
- Stocker, J., Balluch, D., Gsell, M., Harms, H., Feliciano, J., Daunert, S., ... van der Meer, J. R. (2003). Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environmental Science & Technology*, 37(20), 4743–4750.
- Sun, Y., Connor, M. G., Pennington, J. M., & Lawrenz, M. B. (2012). Development of Bioluminescent Bioreporters for In Vitro and In Vivo Tracking of *Yersinia pestis*. *PLOS ONE*, 7(10), e47123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047123>
- Tenson, T., Lovmar, M., & Ehrenberg, M. (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 330(5), 1005–1014.
- Tenson, T., & Mankin, A. (2006). Antibiotics and the ribosome. *Molecular Microbiology*, 59(6), 1664–1677. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05063.x>
- Teuber, M., Meile, L., & Schwarz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1–4), 115–137.
- Trang, P. T. K., Berg, M., Viet, P. H., Mui, N. V., & van der Meer, J. R. (2005). Bacterial Bioassay for Rapid and Accurate Analysis of Arsenic in Highly Variable Groundwater Samples. *Environmental Science & Technology*, 39(19), 7625–7630. <https://doi.org/10.1021/es050992e>
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>

- Urban, A., Eckermann, S., Fast, B., Metzger, S., Gehling, M., Ziegelbauer, K., ... Freiberg, C. (2007). Novel Whole-Cell Antibiotic Biosensors for Compound Discovery. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6436–6443. <https://doi.org/10.1128/AEM.00586-07>
- van der Meer, J. R., & Belkin, S. (2010). Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 511–522. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2392>
- Virolainen, N. E., Pikkemaat, M. G., Elferink, J. W. A., & Karp, M. T. (2008). Rapid Detection of Tetracyclines and Their 4-Epimer Derivatives from Poultry Meat with Bioluminescent Biosensor Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11065–11070. <https://doi.org/10.1021/jf801797z>
- Wang, B., Barahona, M., & Buck, M. (2013). A modular cell-based biosensor using engineered genetic logic circuits to detect and integrate multiple environmental signals. *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1), 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.011>
- Wegener, H. C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), 439–445.
- Wiles, S., Whiteley, A. S., Philp, J. C., & Bailey, M. J. (2003). Development of bespoke bioluminescent reporters with the potential for in situ deployment within a phenolic-remediating wastewater treatment system. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 667–677. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00203-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00203-3)
- Williams, T. M., Burlein, J. E., Ogden, S., Kricka, L. J., & Kant, J. A. (1989). Advantages of firefly luciferase as a reporter gene: application to the interleukin-2 gene promoter. *Analytical Biochemistry*, 176(1), 28–32.
- Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>

- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451–1470.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>
- Xu, T., Close, D. M., Sayler, G. S., & Ripp, S. (2013). Genetically modified whole-cell bioreporters for environmental assessment. *Ecological Indicators*, 28, 125.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.01.020>
- Yang, L., Zhou, Y., Zhu, S., Huang, T., Wu, L., & Yan, X. (2012). Detection and Quantification of Bacterial Autofluorescence at the Single-Cell Level by a Laboratory-Built High-Sensitivity Flow Cytometer. *Analytical Chemistry*, 84(3), 1526–1532.  
<https://doi.org/10.1021/ac2031332>
- Yanofsky, C. (1971). Tryptophan Biosynthesis in Escherichia coli: Genetic Determination of the Proteins Involved. *JAMA*, 218(7), 1026–1035.  
<https://doi.org/10.1001/jama.1971.03190200058012>
- Zhou, J., Lin, J., Zhou, C., Deng, X., & Xia, B. (2011). Cytotoxicity of red fluorescent protein DsRed is associated with the suppression of Bcl-xL translation. *FEBS Letters*, 585(5), 821–827. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.013>

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

RbCl competent cell - OpenWetWare. (n.d.). Külastamise kuupäev: 7. mai 2018, lehekülg

[https://openwetware.org/wiki/RbCl\\_competent\\_cell](https://openwetware.org/wiki/RbCl_competent_cell)

Sir Alexander Fleming - Nobel Lecture: Penicillin. (n.d.). Külastuse kuupäev: 21. mai 2018,

lehekülg [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html)

DH5-Alpha E.coli - microbewiki. (n.d.). Külastuse kuupäev: 25. mai 2018, lehekülg

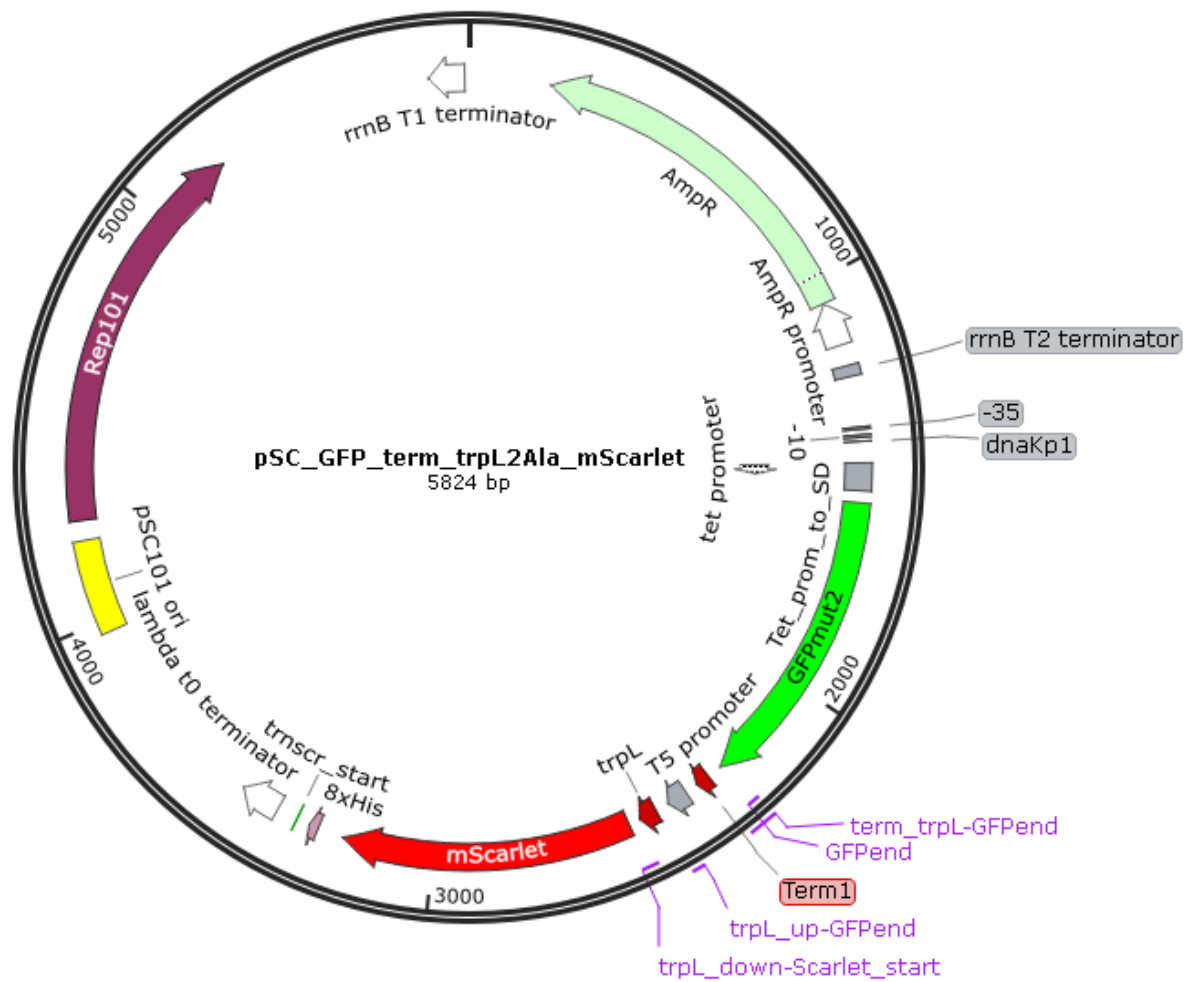
[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/DH5-Alpha\\_E.coli](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/DH5-Alpha_E.coli)

Autofluorescence of Bacteria. (n.d.). Külastuse kuupäev: 25. mai 2018, lehekülg

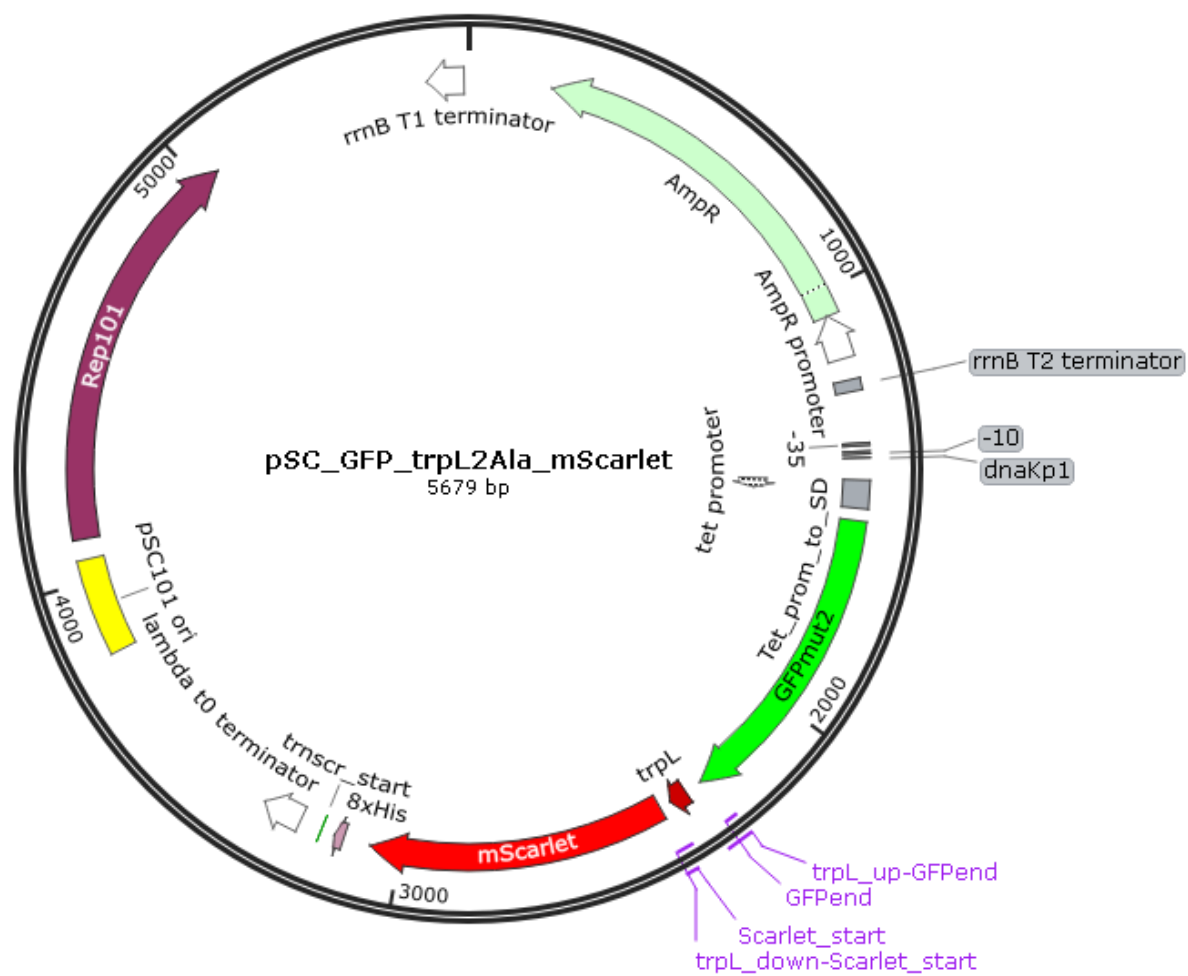
[http://microbiology.okstate.edu/faculty/jtblank/JTB%20Web%20site%20Aug%2000.h  
tm](http://microbiology.okstate.edu/faculty/jtblank/JTB%20Web%20site%20Aug%2000.htm)

# LISA 1

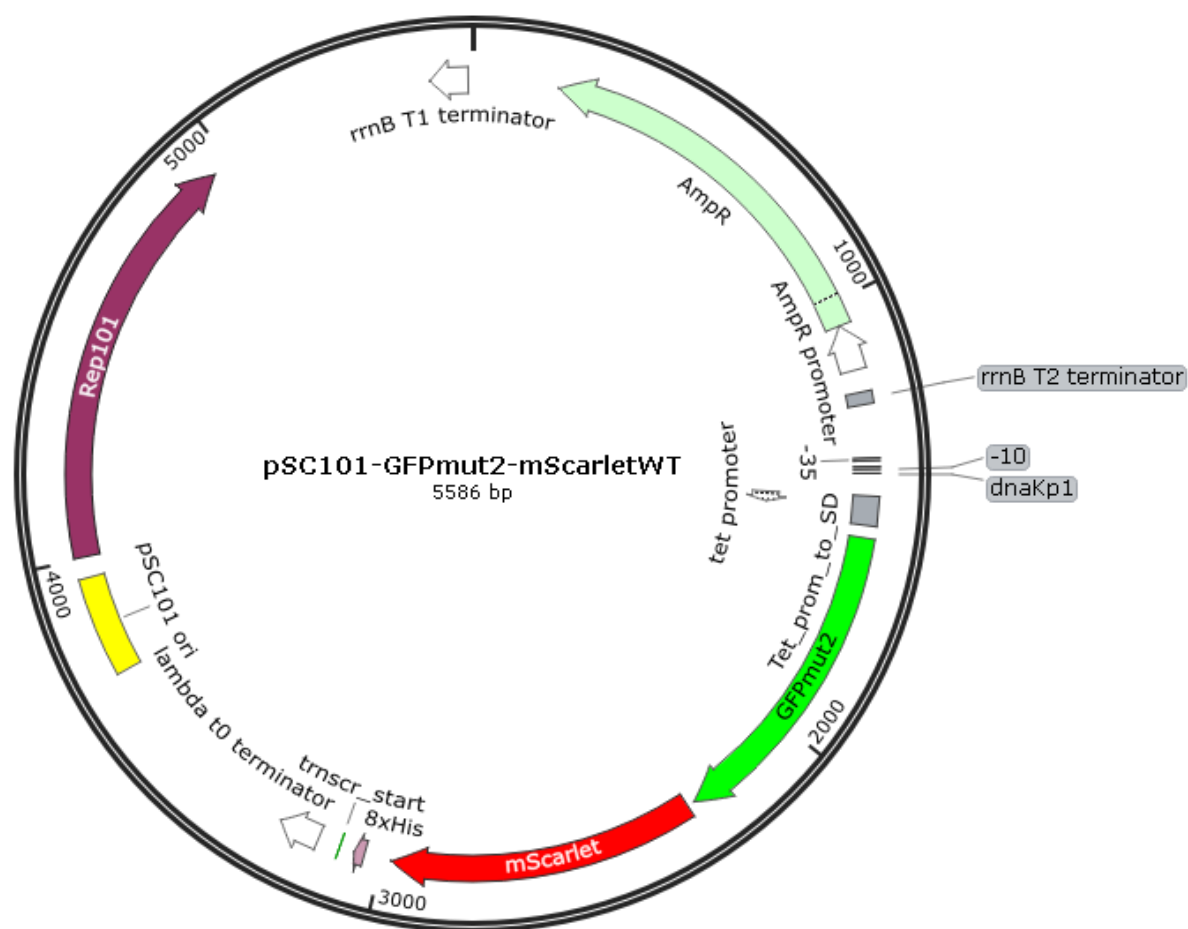
Konstrueeritud plasmiid pSC101\_GFP\_term\_trpL2Ala\_mScarlet



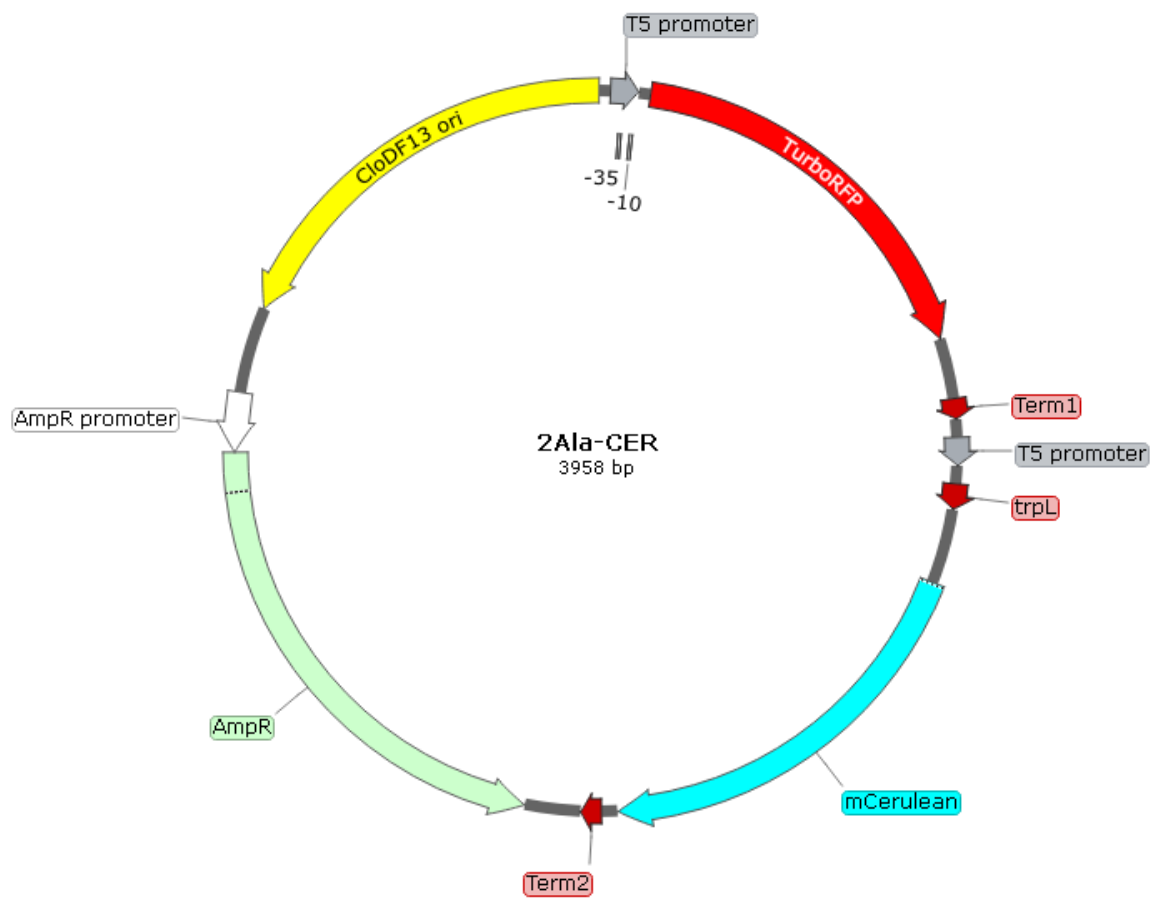
# Konstrueeritud plasmiid pSC101\_GFP\_trpL2Ala\_mScarlet



# Doonorplasmid pSC101-GFPmut2-mScarletWT

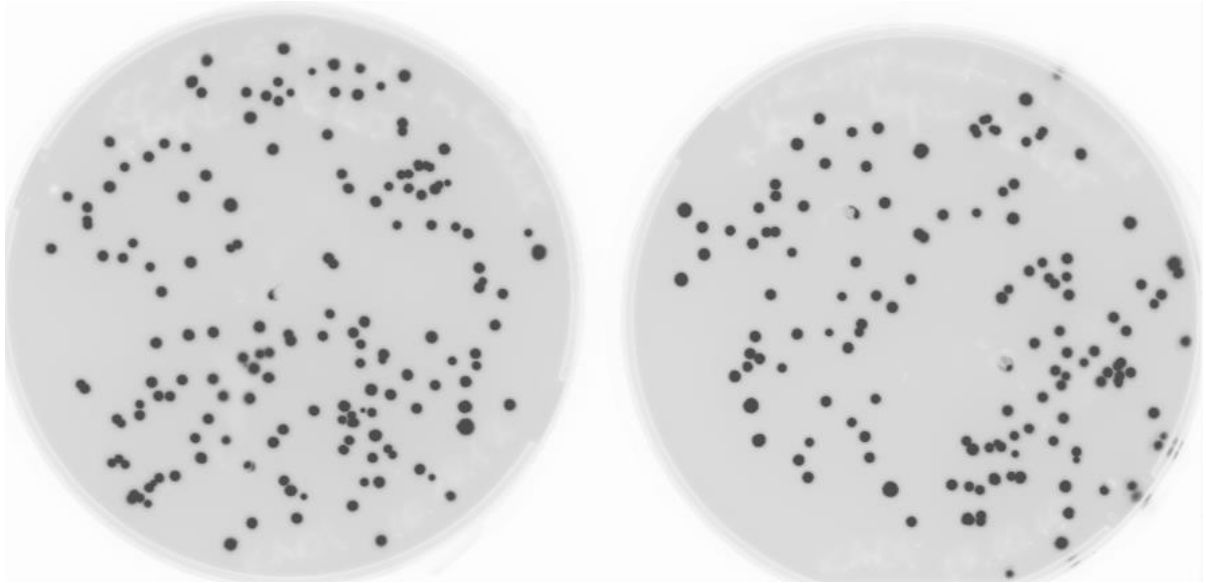


## Doonorplasmid 2Ala-CER



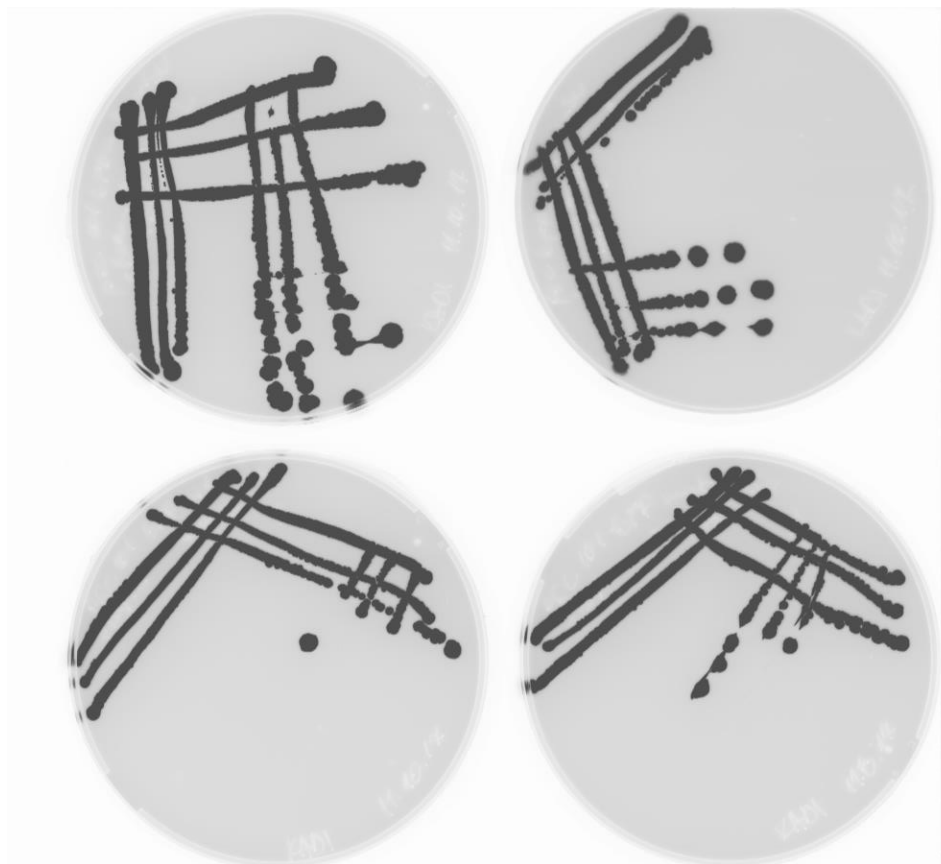


## LISA 2



**Transformatsioonitassid. *E. coli* tüve MG1655 kolooniad. Vasakpoolse tassi bakterid sisaldavad plasmidi pSC101\_GFP\_trpL2Ala\_Scarlet ning parempoolse tassi bakterid plasmidi pSC101\_GFP\_term\_trpL2Ala\_Scarlet. Tume koloonia värvus tähendab positiivset GFP signaali.**

### LISA 3



**Joonis 11. MG1655 transformatsioonitasside edasikülv. Ülemine rida - pSC101\_GFP\_term\_trpL2Ala\_Scarlet ning alumine rida - pSC101\_GFP\_trpL2Ala\_Scarlet. Antud tassidega kontrolliti Typhoon skaneerijat kasutades rohelise fluorestsentsi olemasolu ja selles veendudes valmistati DMSO säilituskultuurid.**

# LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.

Mina, Kadi Sagor, (sünnikuupäev: 31.12.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**Fluorestsentsil põhineva bioreporterite konstrueerimine valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide detekteerimiseks bakteris *Escherichia coli***“ mille juhendajad on doktorant Mariliis Hinnu ja teadur Marta Putrinš,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018